



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS
BIOACTIVOS DE *PAECILOMYCES* SP.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Enrique Aguilar Ramírez



CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios
VOCAL: Profesor: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
SECRETARIO: Profesor: Dr. José Alberto Rivera Chávez
1er. SUPLENTE: Profesor: M. en C. María Eugenia Mendoza Jasso
2° SUPLENTE: Profesor: I.Q. Karla Montserrat González Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA: JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ

SUSTENTANTE: ENRIQUE AGUILAR RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

- Al Programa UNAM-PAPIT IA200818 por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación.
- Al CONACyT por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación, a través del proyecto de infraestructura No. 295057.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Cáncer	2
2.1.1 Panorama mundial y nacional del cáncer	2
2.1.2 Tratamiento del cáncer	2
2.2 Estado actual de la investigación en productos naturales	3
2.3 Tratamientos derivados de productos naturales	5
2.4 Calmodulina y su importancia en el desarrollo y progresión de tumores	5
2.4.1 Inhibidores de calmodulina; una oportunidad para tratar el cáncer	7
2.4.2 Productos naturales como fuente de inhibidores de calmodulina	8
2.5 Antecedentes del género <i>Paecilomyces</i>	11
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos particulares	22
6. PARTE EXPERIMENTAL	23
6.1 Registro de constantes físicas	23
6.2 Toma de muestras	23
6.2.1 Tratamiento de las muestras y obtención de cultivos axénicos	24
6.3 Caracterización taxonómica de microorganismos	25
6.4 Procedimientos cromatográficos generales	25
6.5 Estudio químico de <i>Paecilomyces</i> sp.	26
6.5.1 Cultivos en pequeña escala de microorganismos fúngicos	26
6.5.2 Obtención de extractos orgánicos	27
6.6 Estudios de metabolómica	27
6.6.1 Análisis de redes moleculares	27

6.7 Preparación de cultivo en mediana escala y obtención de extractos orgánicos de IQ-023	28
6.7.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de la especie fúngica IQ-023 .	29
6.8 Estudios de acoplamiento molecular	31
6.8.1 Proteínas.....	31
6.8.2 Preparación de los ligandos.....	32
6.8.3 Acoplamiento molecular (AM, Docking)	32
6.9 Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor <i>hCaM M124C-nBBR</i>	32
6.10 Evaluación del potencial citotóxico	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIONES	50
9. PERSPECTIVAS	51
10. REFERENCIAS.....	52
Anexo 1 (Publicación)	57
Anexo 2 (Cartel).....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de casos incidentes de 2018 a 2040 de todos los tipos de cáncer, en ambos sexos de todas las edades, en México.-----	3
Figura 2. Moléculas pequeñas utilizadas en la clínica (del periodo 1940-2014).----	6
Figura 3. Estructura 3D de la CaM.-----	7
Figura 4. Ejemplos de muestras recolectadas para aislamientos de hongos. ----	23
Figura 5. Cultivos de 14 días en medio sólido PDA de los aislamientos axénicos IQ-001-IQ-030.-----	25
Figura 6. Análisis filogenético del aislamiento IQ-023.-----	26
Figura 7. Condiciones cromatográficas del fraccionamiento primario del extracto de IQ-023.-----	29
Figura 8. Cromatograma del fraccionamiento secundario preparativo de 01001-60-7.-----	31
Figura 9. Estrategia general para la obtención de antagonistas de la CaM con actividad citotóxica a partir de microorganismos fúngicos. -----	35
Figura 10. Actividad citotóxica del extracto de IQ-023 sobre las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de pecho) y MDA-MB-435 (melanoma).-----	36
Figura 11. A) y C) Espectros de masas de extractos de IQ-023 en arroz y Cheerios®, respectivamente. B) y D) Espectros de UV-Vis de extractos de IQ-023 en A y C, respectivamente.-----	37
Figura 12. Análisis de redes moleculares.-----	38
Figura 13. Espectro de masas de alta resolución para la militarinona A (71). ----	40
Figura 14. Perfil de UV de la militarinona A (71).-----	41
Figura 15. Espectro de ¹ H-RMN de la militarinona A (71), obtenido a 700 MHz en CD ₃ OD.-----	41
Figura 16. Espectro de ¹³ C-RMN de la militarinona A (71), obtenido a 175 MHz en CD ₃ OD.-----	41
Figura 17. Espectro bidimensional de correlaciones HSQC para la militarinona A (71).-----	43
Figura 18. Espectro bidimensional de correlaciones COSY para la militarinona A (71).-----	43
Figura 19. Espectro bidimensional de correlaciones HMBC para la militarinona A (71).-----	44
Figura 20. Sistemas de spin que pertenecen a estructuras parciales de la militarinona A (71).-----	44
Figura 21. Acoplamientos ¹ H→ ¹³ C a 3 y 4 enlaces para la militarinona A (71).---	44

Figura 22. Propuesta biosintética para la formación de la militarinona A (71). ----	45
Figura 23. Ensayo de unión de militarinona A (71) con la CaM. -----	46
Figura 24. Actividad citotóxica de militarinona A (71).-----	47
Figura 25. Modelo estructural generado para la militarinona A (71) en complejo con la calmodulina. -----	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de metabolitos fúngicos que inhiben a calmodulina. -----	8
Tabla 2. Policétidos representativos aislados del género <i>Paecilomyces</i> . -----	12
Tabla 3. Terpenoides representativos aislados del género <i>Paecilomyces</i> . -----	16
Tabla 4. Alcaloides representativos aislados del género <i>Paecilomyces</i> . -----	17
Tabla 5. Metabolitos de biosíntesis mixta aislados del género <i>Paecilomyces</i> . ----	17
Tabla 6. Péptidos representativos aislados del género <i>Paecilomyces</i> . -----	19
Tabla 7. Datos generales de las muestras de estudio recolectadas. -----	24
Tabla 8. Agrupamiento de fracciones primarias del extracto de IQ-023. -----	30
Tabla 9. Agrupamiento de fracciones del fraccionamiento de 01001-60-7. -----	31
Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C para la militarinona A (71) en CD ₃ OD (¹ H a 700 MHz y ¹³ C a 175 MHz). -----	42
Tabla 11. Evaluación de la actividad citotóxica de la militarinona A (71) contra diversas líneas celulares tumorales. -----	47

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado
CaM	Calmodulina
°C	Grados Celsius
μM	Micromolar
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
Å	Amstrong
AcOH	Ácido acético
ADT	Autodock Tool
Ala	Alanina
ASTM	Sociedad Americana para evaluación y materiales
ATCC	American Type Culture Collection
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CPD	Caldo Papa Dextrosa
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CO ₂	Dióxido de carbono
d	Señal doble
Da	Dalton
DAD	Detector de arreglo de diodos
dd	Doble de dobles
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido deoxirribonucleico
DPN	Derivado de un producto natural
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EM-ESI	Espectrometría de masas en modalidad de ionización por electrospray
FB	Fármaco botánico
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fármaco sintético
FS*	Fármaco sintético con farmacóforo conocido de un producto natural
FS*/MN	Fármaco sintético con farmacóforo conocido de un producto natural que mimetiza la actividad un producto natural
FS/MN	Fármaco sintético que mimetiza la actividad de un producto natural
g	Gramo
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
h	Horas
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución en modalidad de ionización por electrospray
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
Hz	Hertz
IQ-023	Aislamiento fúngico número 23

ITS	Espaciador transcrito interno del DNA ribosomal
J	Constante de acoplamiento
k_d	Constante de disociación
L_0	Concentración de ligando
Leu	Leucina
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
m/z	Relación masa/carga
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
NaOAc	Acetato de sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
P_0	Concentración de proteína
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDB	Banco de datos de proteínas
Phe	Fenilalanina
PN	Producto natural inalterado
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
UPLC-UV- HRESIMS-MS/MS	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
δ_c	Desplazamiento químico en el espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13
$\Delta G_{unión}$	Energía libre de unión
δ_H	Desplazamiento químico en el espectro de resonancia magnética nuclear de protón
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
μm	Micrometro
μM	Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

La calmodulina (CaM) es considerada la principal proteína reguladora de calcio en células eucariontes. Esta proteína juega un papel muy importante en la transducción de señales intracelulares de calcio, y por lo tanto, regula numerosos procesos fisiológicos y patológicos. En el cáncer, por ejemplo, la CaM se encuentra implicada en el desarrollo y progresión de tumores. En este contexto, el presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un programa multidisciplinario encaminado a la obtención de antagonistas de la CaM de origen natural (metabolitos secundarios de hongos microscópicos) con actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales. Así, el estudio químico de la especie *Paecilomyces* sp. permitió el aislamiento de la militarinona A (**71**). El producto **71** se caracterizó utilizando diversas técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor *hCaM-M124C-mBB*, indicaron que el producto **71** se une de manera directa a la CaM; la magnitud de la constante de disociación se encuentra en el orden de concentraciones nanomolares. Estudios de citotoxicidad *in vitro* contra diversas líneas celulares (MDA-MB-231, MDA-MB-435 y OVCAR3) indicaron que el compuesto **71** es un excelente agente citotóxico. Finalmente, los estudios de acoplamiento molecular permitieron proponer que el compuesto **71** se une a la CaM de manera no clásica en un sitio similar al del antitumoral KAR-2, un derivado semisintético del antitumoral vinblastina.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer, comprende una colección de enfermedades relacionadas en las que las células del cuerpo se dividen descontroladamente y se esparcen hacia los tejidos circundantes; se origina por cambios en los genes que controlan la forma en la que las células funcionan, específicamente en relación a cómo crecen y se dividen [1]. Estos cambios genéticos pueden ser heredados u originarse en el curso de la vida de una persona, como resultado de la exposición a factores ambientales y/o antropogénicos (e.g. sustancias químicas cancerígenas, radiación e infecciones) [2].

2.1.1 Panorama mundial y nacional del cáncer

Este padecimiento es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En septiembre del 2018 se registraron más de 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad y se anticipa que en el 2040 se presentarán 29.5 millones de casos nuevos. En México, el número de casos incidentes se estimó en 190,667 al 2018 y se prevé que sean 359,542 en el 2040 (**Figura 1**). A la fecha, el cáncer de mama es el de mayor incidencia en este país, con 27,283 casos reportados y 6,884 muertes asociadas a este tipo de cáncer [3,4].

2.1.2 Tratamiento del cáncer

Actualmente, la mayoría de los pacientes que padecen cáncer reciben una combinación de tratamientos, como cirugía con quimioterapia y/o radioterapia; mientras que algunos otros se someten a inmunoterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre, terapia dirigida (que contempla los cambios moleculares expresados por células cancerosas) y terapia personalizada (que se basa en los cambios genéticos particulares generados en el tumor de un paciente) [5-7].



Figura 1. Número estimado de casos incidentes de 2018 a 2040 de todos los tipos de cáncer, en ambos sexos de todas las edades, en México [4].

2.2 Estado actual de la investigación en productos naturales

Los productos naturales han sido tradicionalmente una fuente importante de fármacos, *per se* o como moléculas líderes para el desarrollo de productos más eficaces [5,8-16]. Sin embargo, en las décadas comprendidas entre 1990 y 2010, la industria farmacéutica se inclinó por el desarrollo de nuevos fármacos a partir de moléculas generadas de librerías sintéticas, mediante procesos de evaluaciones farmacológicas de alto rendimiento (*High-Throughput Screening*, HTS por sus siglas en inglés) [17,18]. Las razones principales de este cambio de estrategia incluyen: (i) el tiempo y costo involucrado en los procesos de aislamiento y caracterización de productos naturales; (ii) los bajos rendimientos de estos productos; (iii) el aislamiento continuo de compuestos conocidos; (iv) la complejidad de muchas sustancias naturales que dificulta su síntesis; (v) y en muchos casos las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos resultan incompatibles con los sistemas biológicos [18,19].

La eficacia limitada de las técnicas de HTS y química combinatoria para la generación de moléculas líderes, así como la prevalencia global de enfermedades degenerativas como el cáncer, la artritis reumatoide, la diabetes mellitus, y padecimientos infecciosos resistentes a tratamientos de última generación,

renovaron el interés por la búsqueda de productos naturales con estructuras novedosas para solventar estos graves problemas de salud pública. En la búsqueda de nuevos productos naturales es recomendable estudiar organismos provenientes de nichos ecológicos poco explorados, implementar métodos analíticos que permitan detectar rápidamente la presencia de moléculas conocidas y generar análogos con propiedades farmacocinéticas deseadas, a través de procesos de síntesis parcial y/o biosíntesis dirigida.

Los microorganismos producen la mayoría de los fármacos de importancia utilizados en la terapéutica contemporánea [20]. La amplia diversidad estructural mostrada por los metabolitos bacterianos y fúngicos se refleja en sus múltiples actividades farmacológicas. Así, por ejemplo, muchos son antibióticos y fungicidas (penicilina, eritromicina, tetraciclina, vancomicina y anfotericina, etc.), otros anticancerígenos (daunorubicina, bleomicina, doxorubicina, mitomicina, etc.) e inmunosupresores (ciclosporina, rapamicina, etc.) y, los menos, antihipercolesterolemiantes (lovastatina y mevastatina) o antidiabéticos (acarbose).

En términos de biodiversidad, el reino fúngico constituye uno de los más vastos. Diferentes estudios sugieren que existen entre 1.5 y 3.8 millones de especies fúngicas [21], de las cuales, sólo alrededor del 5% han sido identificadas y un número aún menor de cepas han sido estudiadas desde el punto de vista químico [22]. En este contexto, es evidente que existen muchos microorganismos fúngicos por estudiar con la finalidad de obtener nuevos metabolitos secundarios [23]. Un estudio realizado por Ito y colaboradores en 2011 demostró que cada microorganismo puede producir entre uno y tres metabolitos nuevos [24]. Tomando en cuenta estos datos, se estima que el reino fúngico tiene una reserva potencial de entre 4.5 y 11.4 millones de nuevos productos naturales, útiles en los campos de la medicina, agricultura e industria alimentaria [22].

Por otra parte, un estudio reciente realizado por los grupos de investigación de los Doctores Medina-Franco y Figueroa de la Facultad de Química de la UNAM, demostró que los metabolitos secundarios aislados a partir de ascomicetos tienen las siguientes características:

- Presentan una elevada complejidad y diversidad estructural, así como propiedades fisicoquímicas similares a las de fármacos aprobados por la FDA.
- En la mayoría de los casos son específicos para sus blancos moleculares.
- Son menos tóxicos.
- Son una fuente atractiva para la obtención de moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos [25].

2.3 Tratamientos derivados de productos naturales

En el área del cáncer, de 1940 a finales del 2014, de 175 moléculas pequeñas utilizadas clínicamente, el 75% fueron productos naturales *per se*, se basaron en estos, o de alguna forma mimetizan un producto natural (**Figura 2**) [16]. Entre los principales blancos farmacológicos de estas moléculas destacan aquellos que interactúan con la tubulina, inhiben las topoisomerasas I y II, inhiben la histona deacetilasa, inhiben a las proteínas cinasas, inhiben proteínas de choque térmico, inhiben el proteosoma, agentes que interactúan con DNA (que no actúan como inhibidores de topoisomerasas), agentes que activan caspasas y/o inducen apoptosis, inhiben el factor inducible de hipoxia [26] y más recientemente, aquellos ligantes de la calmodulina (CaM) [27].

2.4 Calmodulina y su importancia en el desarrollo y progresión de tumores

La calmodulina es considerada la principal proteína reguladora de calcio en células eucariontes. Su distribución ubicua, su elevada conservación durante la evolución y su amplio espectro de funciones subraya la importancia de esta proteína de unión a calcio en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y patológicos [28-31].

La CaM es una proteína pequeña de 148 residuos de aminoácidos organizados en dos dominios globulares, cada uno con dos sitios de unión a Ca^{2+} (**Figura 3**) [32]. Ambos dominios están unidos por un conector flexible, el cual está involucrado en las interacciones de CaM con sus proteínas blanco y antagonistas [30,32]. En su

conformación Apo, la CaM está cerrada por sus dos dominios homólogos. Una vez que el Ca^{2+} se une en ambos dominios, la conformación de la CaM cambia a la forma abierta, permitiendo que las proteínas blanco accedan a la cavidad hidrofóbica localizada en la parte interna de cada dominio [28]. Por lo tanto, los antagonistas de CaM generalmente poseen una parte hidrofóbica y una cadena lateral cargada. La parte hidrofóbica de los antagonistas es requerida para la unión con el carboxilo y/o amino terminal que se ubican en la cavidad hidrofóbica de la CaM, mientras que la cadena lateral previene que las proteínas blanco accedan a la cavidad hidrofóbica de la CaM [33].

En relación al cáncer, la CaM se encuentra implicada en el desarrollo y progresión de tumores. Procesos tales como la activación de cinasas dependiente de ciclina/complejos de ciclina, el metabolismo de nucleótidos, la síntesis de DNA, la reorganización de cromosomas y la citocinesis son dependientes de la presencia de CaM [27].

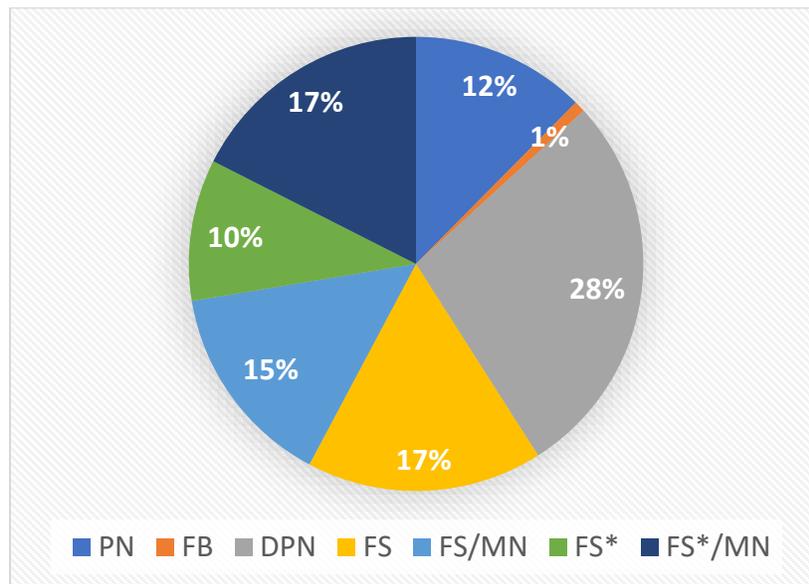


Figura 2. Moléculas pequeñas utilizadas en la clínica (del periodo 1940-2014), divididas en las categorías: Producto natural inalterado (PN), Fármaco botánico (FB), Derivado de un producto natural (DPN), Fármaco sintético (FS), Fármaco sintético que mimetiza la actividad de un producto natural (FS/MN), Fármaco sintético con farmacóforo conocido de un producto natural (FS*), Fármaco sintético con farmacóforo conocido de un producto natural que mimetiza la actividad de un producto natural (FS*/NM).

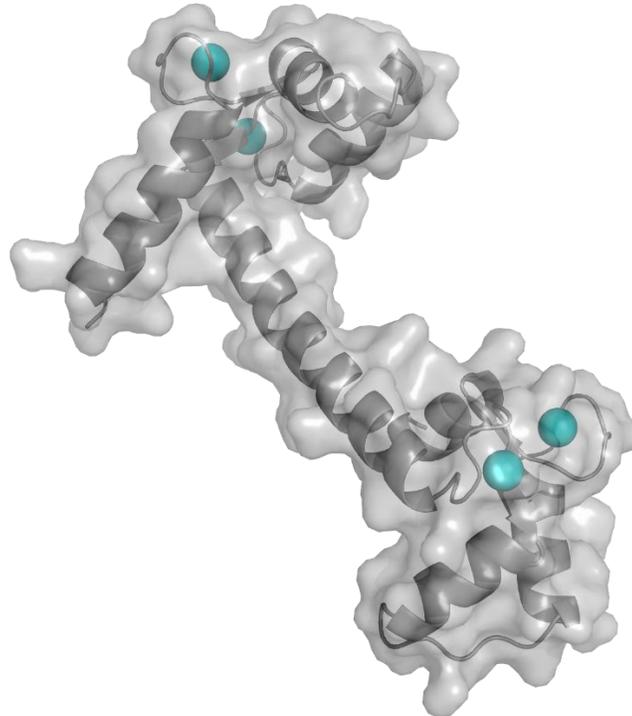


Figura 3. Estructura 3D de la CaM. En color azul se muestran los átomos de calcio (Ca^{2+}). La estructura se obtuvo del banco de datos de proteínas (PDB) con el código 1CLL. EL modelo se generó utilizando PyMol.

Así, el flujo de calcio extracelular hacia el interior de la célula bajo la estimulación de factores de crecimiento es esencial para iniciar la proliferación celular. El complejo Ca^{2+} /CaM desempeña un papel transductor en eventos de señalización mediante el control directo o indirecto de vías mitogénicas y de la maquinaria del ciclo celular; especialmente actuando en la transición de la fase G_1/S y en las fases G_2 y M [27].

2.4.1 Inhibidores de calmodulina; una oportunidad para tratar el cáncer

Los antagonistas de CaM inducen apoptosis en diversos modelos tumorales e inhiben la metástasis; algunos de los cuales son usados como agentes anticancerígenos [34], entre los que destacan la vincristina y vinblastina [30]. Esta evidencia pone de manifiesto que un antagonista de la CaM puede presentar actividad antitumoral.

2.4.2 Productos naturales como fuente de inhibidores de calmodulina

Los productos naturales antagonistas de CaM poseen una diversidad estructural ilimitada; entre estos, los obtenidos de microorganismos fúngicos han demostrado ser los más potentes. Ejemplos de estos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ejemplos de metabolitos fúngicos que inhiben a calmodulina.

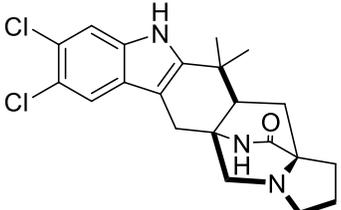
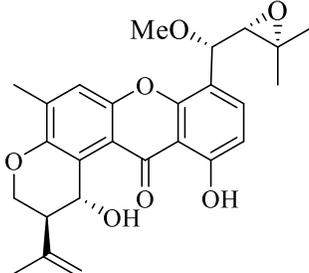
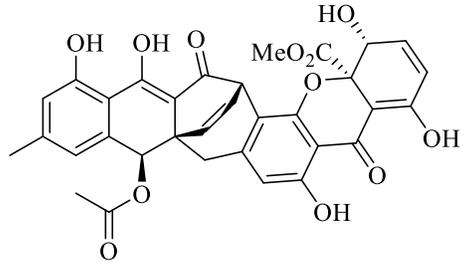
Molécula	K_d	Fuente de obtención
 Malbranqueamida (1)	1.1 μ M	<i>Malbranchea aurantiaca</i> [35]
 14-metoxitajixantona (2)	3.7 nM	<i>Emericella sp.</i> [36]
 Acremoxantonca C (3)	18.3 nM	<i>Purpureocillium lilacinum</i> [37]

Tabla 1. Ejemplos de metabolitos fúngicos que inhiben a calmodulina (continuación).

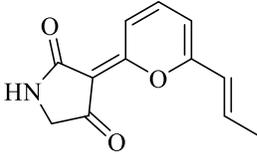
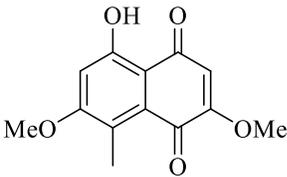
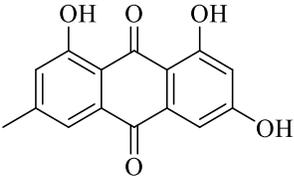
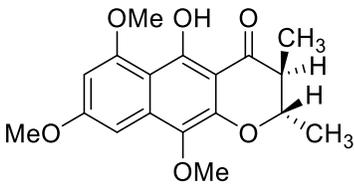
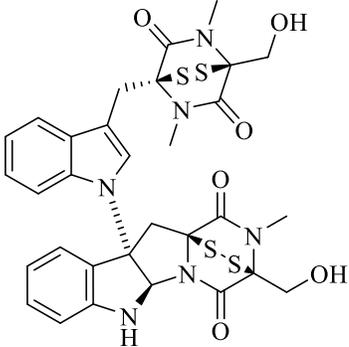
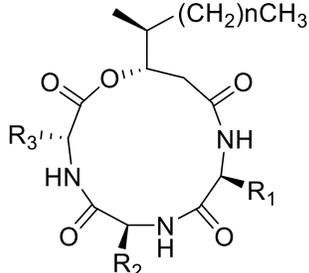
Molécula	K_d	Fuente de obtención
 <p>Vermelhotina (4)</p>	0.25 μ M	MEXU 26343 [38]
 <p>Naftoquinona (5)</p>	1.6 μ M	<i>Sporomiella minimoides</i> [39]
 <p>Emodina (6)</p>	0.33 μ M	<i>Aspergillus stromatoides</i> [40]
 <p>Naftopirona (7)</p>	0.39 μ M	<i>Guanomyces polythrix</i> [41]

Tabla 1. Ejemplos de metabolitos fúngicos que inhiben a calmodulina (continuación).

Molécula	K_d	Fuente de obtención
 <p>Epipolitiiodioxopiperacina (8)</p>	57 nM	<i>Chaetomium globosum</i> [30]
	K_d : 0.08-3.4 μ M	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> [42]
<p>9) Beauverólido C; R_1= Phe, R_2= Phe, R_3= Ile, n= 5 10) Beauverólido F; R_1= Phe, R_2= Phe, R_3= Ile, n= 3 11) Beauverólido I; R_1= Phe, R_2= Ala, R_3= Leu, n= 3 12) Beauverólido J; R_1= Trp, R_2= Phe, R_3= Ile, n= 3 13) Beauverólido L; R_1= Phe, R_2= Ala, R_3= Ile, n= 5 14) Beauverólido M; R_1= Val, R_2= Ala, R_3= Leu, n= 3 15) Beauverólido N; R_1= Tyr, R_2= Ala, R_3= Leu, n= 3</p>		

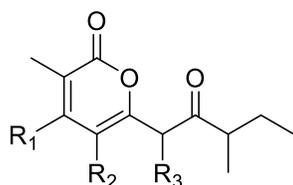
2.5 Antecedentes del género *Paecilomyces*

Paecilomyces sp. es un hongo filamentoso que ha sido aislado de una amplia variedad de hábitats, incluyendo: suelos cultivados y no cultivados, bosques, praderas, desiertos, sedimentos de estuario, e incluso en lodo de aguas negras. Las especies pueden crecer en un amplio rango de temperaturas, desde 8°C a 30°C. Asimismo, posee una amplia tolerancia al pH y puede crecer en una variedad de sustratos, haciéndolo una fuente rica de metabolitos bioactivos diversos [43].

La investigación de los componentes químicos del género de *Paecilomyces* ha llevado al aislamiento de más de 90 compuestos. Los metabolitos secundarios representativos son las paecilotoxinas (moléculas lineales altamente tóxicas; también designadas como leucinostatinas) de *Paecilomyces lilacinus*, paecilodepsipéptidos (ciclohexadepsipéptidos antimaláricos y antitumorales) de *Paecilomyces cinnamomeus* y paeciloquinonas (antraquinonas, inhibidores de tirosinasa) de *Paecilomyces carneus* P-177. A muchos de estos compuestos se les ha atribuido una gran diversidad de actividades biológicas, incluyendo antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral y antitumoral [44]. Así por ejemplo, se han aislado moléculas pertenecientes a muchas clases estructurales, entre las que destacan los terpenoides, alcaloides, policétidos, péptidos no ribosomales y metabolitos de biogénesis mixta. Algunos ejemplos selectos de estas moléculas y sus actividades biológicas se muestran en las **Tablas 2-6**.

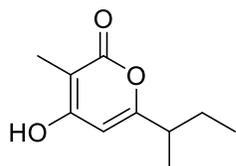
Tabla 2. Policétidos representativos aislados del género *Paecilomyces*.

Policétidos



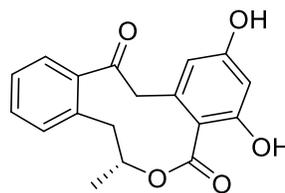
- 16)** Paecilopirona A; R₁=OH R₂= CH₃ R₃= H
17) Paecilopirona B; R₁=CH₃ R₂= H R₃= H
18) Fomapirona A; R₁= OH R₂= H R₃= H

[45]



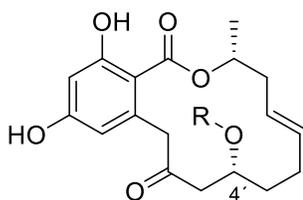
Fomapirona C (**19**)

[45]



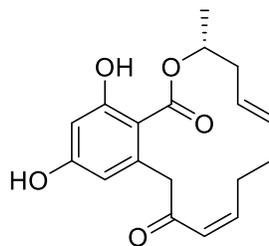
Decloropoconina I (**20**)

[46]



- 21)** 4'-metoximonocilina IV; R=CH₃
22) 4'-hidroximonocilina IV; R= H

[46]



Monocilina VI (**23**)

[46]

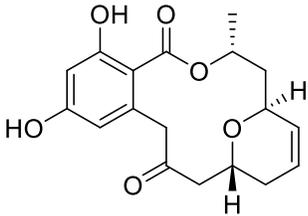
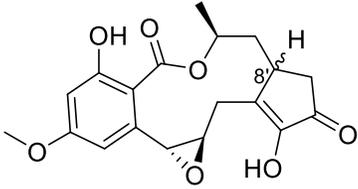
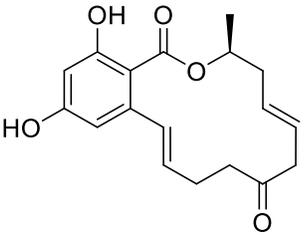
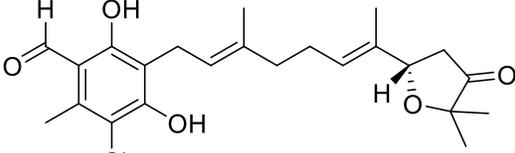
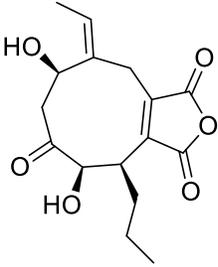
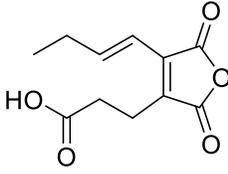
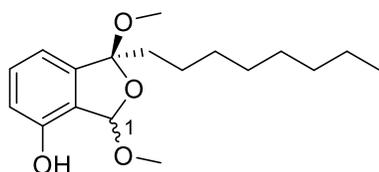
 <p>Monocilina VII (24)</p> <p>[46]</p>	 <p>25) Paecilomicina N; 8'S 26) Paecilomicina O; 8'R</p> <p>[46]</p>
 <p>Paecilomicina P (27)</p> <p>[46]</p>	 <p>Ascofuranona (28)</p> <p>[47]</p>
 <p>Cornexistina (29)</p> <p>[47]</p>	 <p>Ácido 3-furanpropanoico (30)</p> <p>[47]</p>

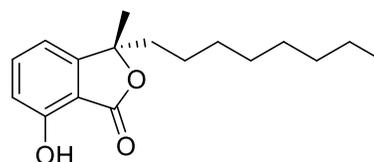
Tabla 2. Policétidos representativos aislados del género *Paecilomyces* (continuación).

Tabla 2. Policétidos representativos aislados del género *Paecilomyces* (continuación).



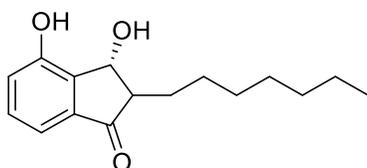
31) 1S; Paecilocina B
32) 1R; Paecilocina C

[48]



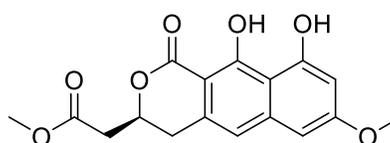
Paecilocina A (**33**)

[48]



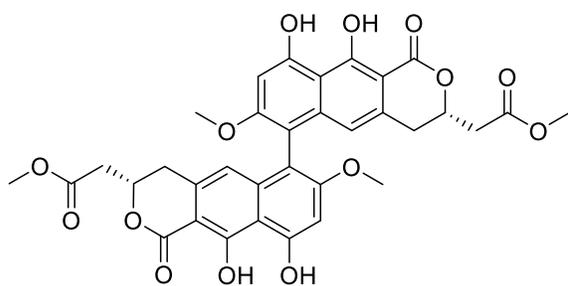
Paecilocina D (**34**)

[48]



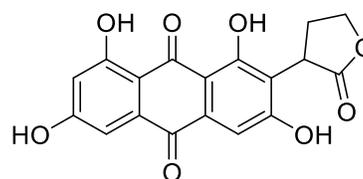
Semiviriditoxina (**35**)

[47]



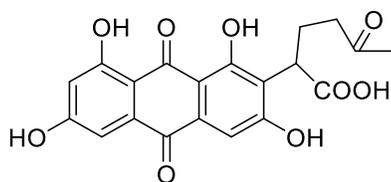
Viriditoxina (**36**)

[47]



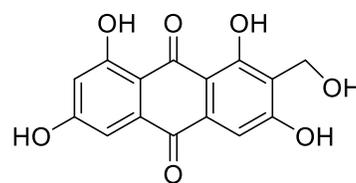
Paeciloquinona A (**37**)

[49]



Paeciloquinona B (**38**)

[49]



Paeciloquinona C (**39**)

[49]

Tabla 2. Policétidos representativos aislados del género *Paecilomyces* (continuación).

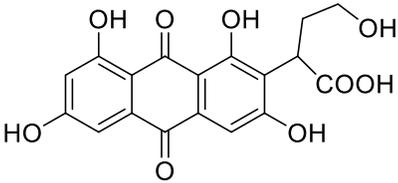
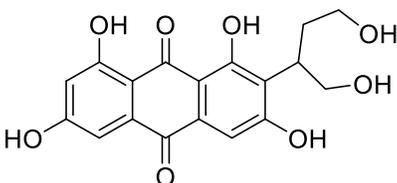
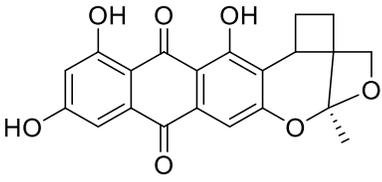
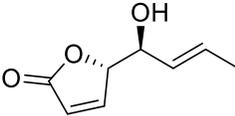
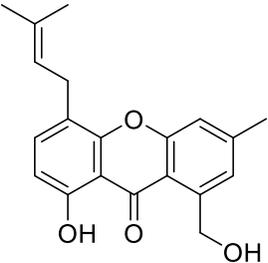
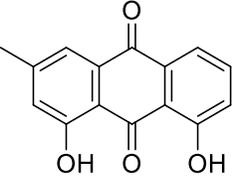
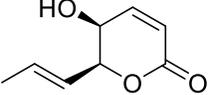
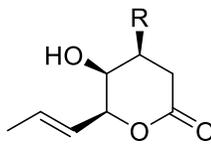
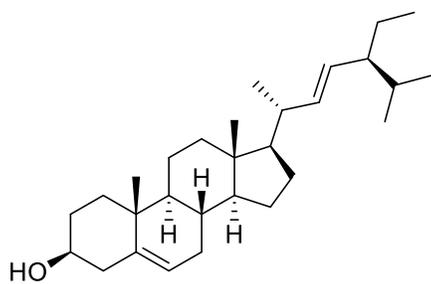
 <p>Paeciloquinona D (40)</p> <p>[49]</p>	 <p>Paeciloquinona E (41)</p> <p>[49]</p>
 <p>Versiconol (42)</p> <p>[49]</p>	 <p>Musacina D (43)</p> <p>[46]</p>
 <p>Paeciloxantona (44)</p> <p>[46]</p>	 <p>Crisofanol (45)</p> <p>[46]</p>
 <p>Fomolactona (46)</p> <p>[44]</p>	 <p>47) Catenioblina A; R= H 48) Catenioblina B; R= OH</p> <p>[44]</p>

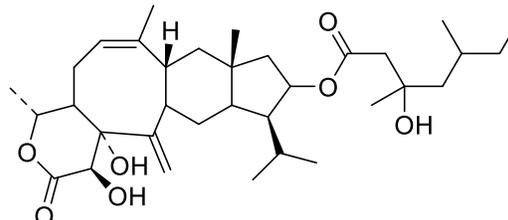
Tabla 3. Terpenoides representativos aislados del género *Paecilomyces*.

Terpenoides



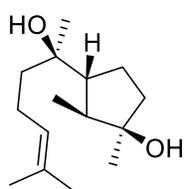
Estigmasterol (49)

[43]



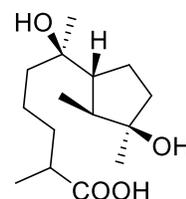
Sester-terpenoide YW3548 (50)

[50]



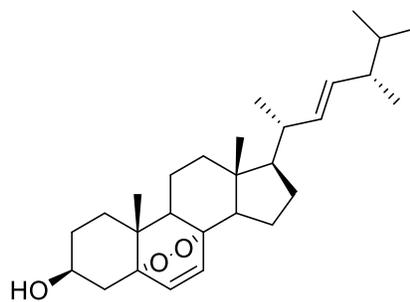
Ciclonerodiol (51)

[44]



Catenioblina (52)

[44]

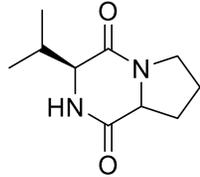


Peróxido de ergosterol (53)

[51]

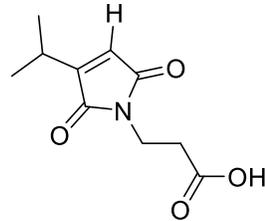
Tabla 4. Alcaloides representativos aislados del género *Paecilomyces*.

Alcaloides



Ciclo(valitriptofil) (**54**)

[44]

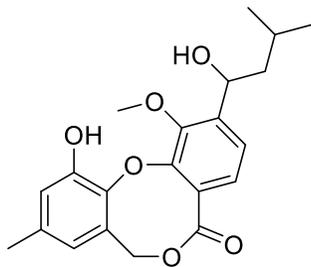


Farinomaleina (**55**)

[52]

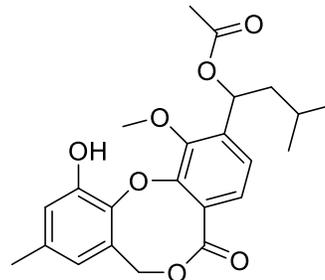
Tabla 5. Metabolitos de biosíntesis mixta aislados del género *Paecilomyces*.

Metabolitos de biosíntesis mixta



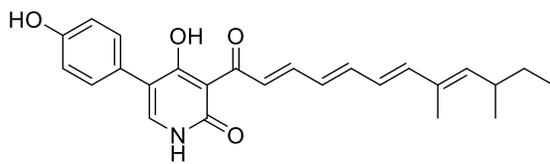
Paeciloxocina A (**56**)

[53]



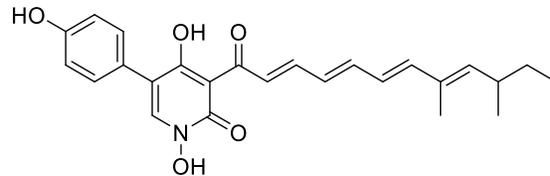
Paeciloxocina B (**57**)

[53]



Farinosona A (**58**)

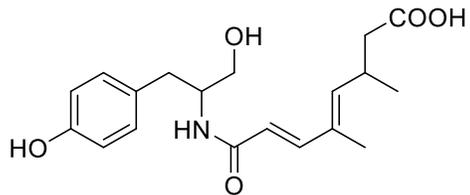
[54]



Farinosona B (**59**)

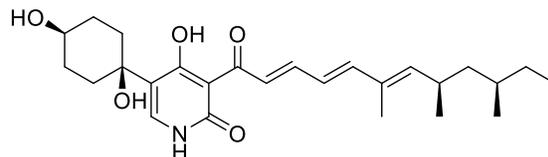
[54]

Tabla 5. Metabolitos de biosíntesis mixta aislados del género *Paecilomyces* (continuación).



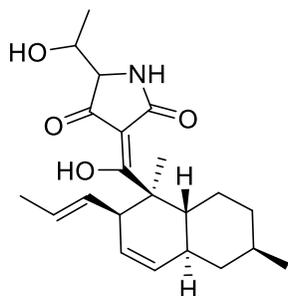
Farinosona C (**60**)

[54]



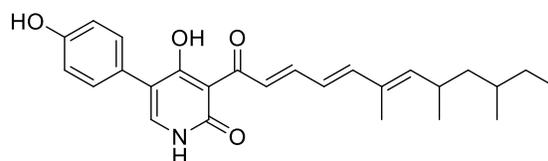
(+)-N-Deoximilitarinona A (**61**)

[55]



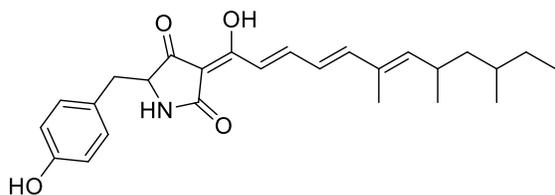
Paecilosetina (**62**)

[56]



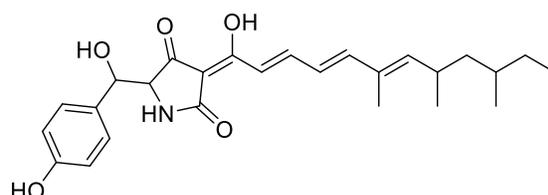
Militarinona D (**63**)

[57]



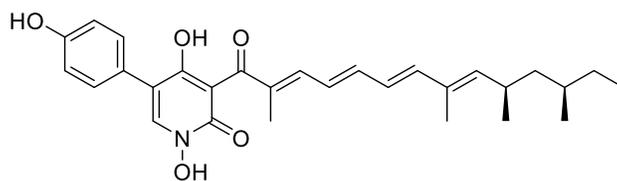
Militarinona C (**64**)

[57]



Militarinona B (**65**)

[57]

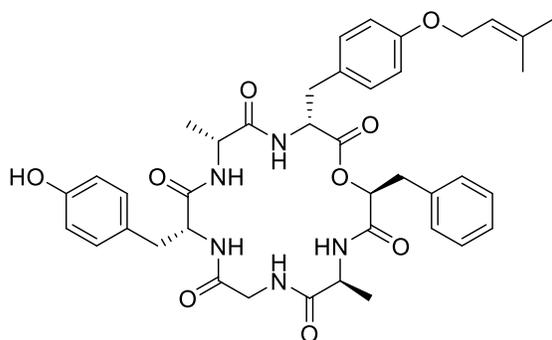


Fumosorinona (**66**)

[58]

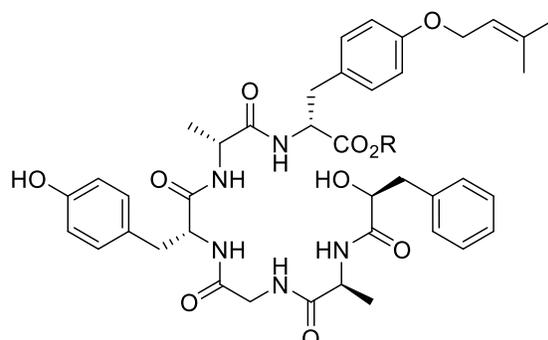
Tabla 6. Péptidos representativos aislados del género *Paecilomyces*.

Péptidos



Paecilodepsipeptido A (67)

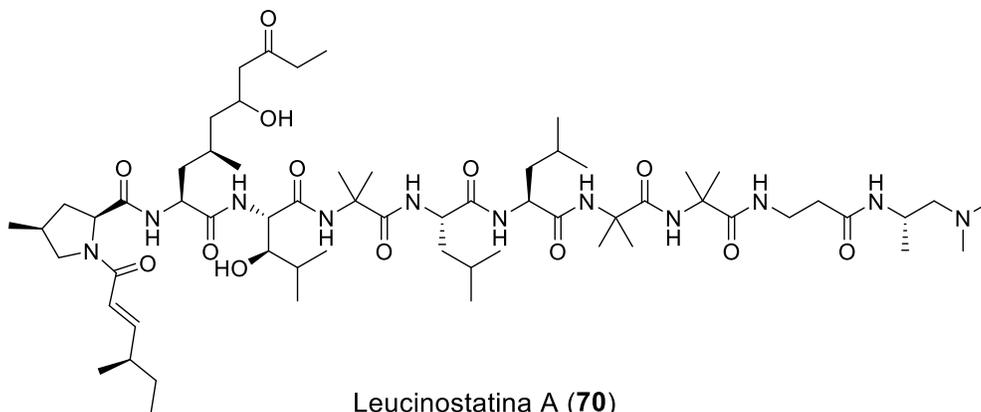
[59]



68) Paecilodepsipeptido B; R= H

69) Paecilodepsipeptido C; R= CH₃

[59]



Leucinostatina A (70)

[44]

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cáncer impacta en la calidad y esperanza de vida de un gran número de personas en México y en el mundo, la investigación en el tratamiento de esta enfermedad es fundamental. Sin embargo, aun con los muchos avances que se han logrado en el tratamiento del cáncer en las décadas recientes, se deben vencer numerosos desafíos; ya que el cáncer de cada individuo comprende una constelación única de mutaciones genéticas y otras alteraciones que incrementan la complejidad de la identificación de tratamientos que funcionen con mayor probabilidad para el cáncer de una persona dada.

En ese sentido, la búsqueda de agentes inhibidores de calmodulina a partir de productos naturales obtenidos de hongos aislados de nichos ecológicos poco explorados, supone una estrategia factible en la identificación de moléculas novedosas que sean útiles en la terapéutica del cáncer.

Por lo tanto, el presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un programa multidisciplinario encaminado a la obtención de antagonistas de la CaM con posible actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales, obtenidos a partir de microorganismos fúngicos aislados de regiones poco exploradas del territorio nacional.

4. HIPÓTESIS

Estudios químicos previos de especies del género *Paecilomyces* (criterio quimiotaxonómico), en conjunto con los resultados preliminares de actividad biológica (citotoxicidad y unión a CaM), sugieren que el aislamiento IQ-023 obtenido en el Cerro del Sombrero en Cuauhtépec, Ciudad de México, representa un candidato idóneo para la obtención de metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Descubrir nuevos agentes inhibidores de calmodulina (CaM) a partir de especies fúngicas selectas, útiles como arquetipos estructurales para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer o como herramientas de investigación.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar microorganismos fúngicos en cultivo axénico, obtenidos a partir de sustratos poco explorados del territorio nacional.
- Cultivar en pequeña escala microorganismos fúngicos de interés químico y farmacológico.
- Obtener el extracto orgánico a partir de los medios de fermentación de las especies fúngicas.
- Evaluar el potencial antagónico sobre la CaM de los extractos fúngicos.
- Reducir la complejidad química de extractos bioactivos empleando la estrategia de fraccionamiento biodirigido, mediante el uso de técnicas analíticas (en particular cromatografía).
- Aislar y caracterizar al menos un metabolito secundario con actividad antagónica de sobre la CaM, con apoyo de técnicas cromatográficas y espectroscópicas.
- Evaluar la actividad citotóxica del compuesto aislado sobre distintas líneas celulares.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular de los metabolitos bioactivos, con la finalidad de establecer su probable sitio de unión con la CaM.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Registro de constantes físicas

Los espectros de RMN-¹H se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Ascend III 700 a 700 (¹H) y 175 MHz (¹³C), utilizando CDCl₃ como disolvente; los desplazamientos químicos fueron registrados en ppm (δ). Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron utilizando ionización por “electrospray” (EM-ESI) en modo positivo y negativo empleando un espectrómetro de masas Thermo Q-Exactive (Thermo Fisher Inc., MA, EEUU). El control del instrumento y el análisis de datos se realizó utilizando el Software Excalibur 3.0 (Thermo). El registro de los espectros se realizó en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, UNCG, Carolina del Norte, EUA.

6.2 Toma de muestras

Para el aislamiento de microorganismos fúngicos se recolectaron muestras de hojarasca, musgo, corteza de árbol, maleza, y tallos sumergidos en depósitos de agua dulce (**Figura 4**), colectadas en la Sierra de Guadalupe (Cerro del sombrero, Cuauhtepac, 19° 34'43.0 “N 99°07'17.5” W; 19°33'52.5” N 99°07'23.3” W, Ciudad de México), siguiendo un criterio ecológico (**Tabla 7**).



Thuidiaceae



Gloria de la mañana



Escarabajo tortuga
(Charidotella)

Figura 4. Ejemplos de muestras recolectadas para aislamientos de hongos.

Tabla 7. Datos generales de las muestras de estudio recolectadas.

Código de muestra	Tipo de muestra	Hongos aislados
M1001-1-1	Hojarasca	IQ-001, IQ-002, IQ-003
M1001-1-2	Suelo	IQ-004, IQ-005, IQ-006
M1001-1-3	Musgo (Thuidiaceae)	IQ-007, IQ-008, IQ-009
M1001-1-4	Corteza de un árbol	IQ-010, IQ-011, IQ-012, IQ-013
M1001-1-5	Gloria de la mañana	IQ-014, IQ-015, IQ-016
M1001-1-6	Estiércol de caballo	IQ-017, IQ-018
M1001-1-7	Palo de agua	IQ-019, IQ-020, IQ-021, IQ-022, IQ-023, IQ-024,
M1001-1-8	Suelo húmedo	IQ-025, IQ-026
M100-1-9	Insecto (escarabajo tortuga - Charidotella)	IQ-027, IQ-028, IQ-029, IQ-030

6.2.1 Tratamiento de las muestras y obtención de cultivos axénicos

Cada una de las muestras se fragmentó en trozos de 1-2 mm. Con el fin de reducir la población de microorganismos en la superficie de los trozos, los ejemplares se sometieron al siguiente tratamiento de sanitización: en primer lugar, las muestras se lavaron con agua estéril (1 minuto), posteriormente se sumergieron en una solución al 70% de alcohol etílico (1 minuto), se enjuagaron nuevamente con agua estéril (1 minuto) y posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (30 segundos), se enjuagaron con agua estéril (1 minuto) y se dejaron secar en una gasa estéril. Finalmente, las muestras se sembraron por separado y por triplicado, en cajas de Petri de 100 mm conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA) y amoxicilina (500 mg/L). Estos cultivos se almacenaron a temperatura ambiente. Para el aislamiento de microorganismos fúngicos en cultivo axénico se observaron las colonias de microorganismos que emergieron de las muestras sembradas y se resembraron en cajas de Petri de 60 mm con PDA [60,61]. Una vez obtenidos los cultivos puros de microorganismos, se les asignó una clave de identificación alfanumérica, con independencia de su fuente de origen y se realizó un registro fotográfico de cada uno de estos (**Figura 5**).

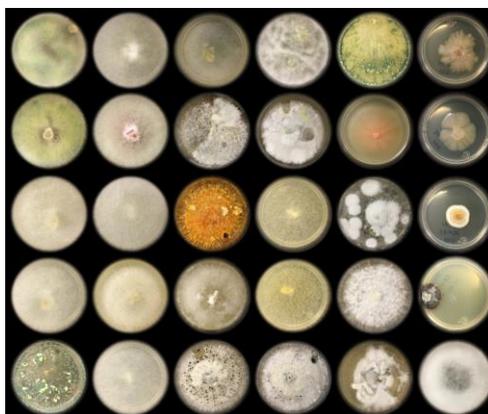


Figura 5. Cultivos de 14 días en medio sólido PDA de los aislamientos axénicos IQ-001-IQ-030.

6.3 Caracterización taxonómica de microorganismos

La identificación taxonómica de aislamiento IQ-023 se realizó mediante análisis de sus características morfológicas y genéticas del espaciador transcrito interno del DNA ribosomal (ITS, por sus siglas en inglés; **Figura 6**). En esta técnica se secuencia la región ITS, ya que posee un alto grado de conservación [62]. Posteriormente, las secuencias se comparan con aquellas depositadas en la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI). Finalmente, las secuencias alineadas se someten a un análisis de máxima similitud y se construye un árbol filogenético que muestra la relación evolutiva entre las especies [63].

6.4 Procedimientos cromatográficos generales

Los análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se realizaron utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de Merck (tamaño de partícula 3.5-7.0 ASTM y de 0.25 mm de espesor). Como eluyentes se emplearon diversas mezclas de disolventes orgánicos (hexanos, CH₂Cl₂, MeOH y AcOH). La visualización de las placas se realizó empleando una lámpara de UV a 250 y 365 nm. Como agente revelador se utilizó sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico concentrado [60].

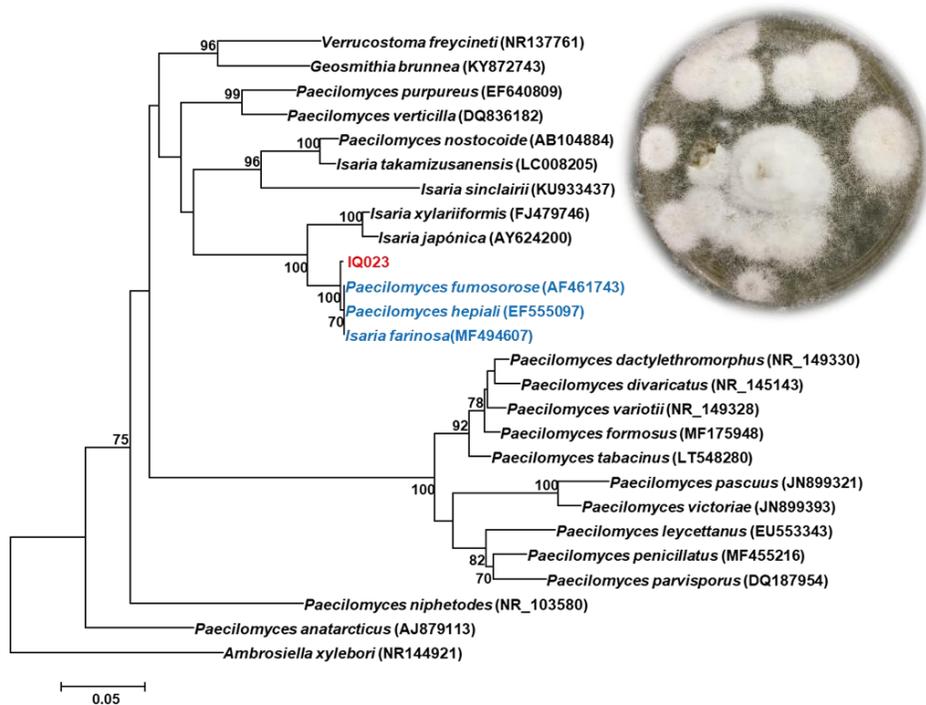


Figura 6. Análisis filogenético del aislamiento IQ-023. El análisis de máxima similitud de la región espaciadora interna (ITS, por sus siglas en inglés) de IQ-023 permitió identificar al microorganismo como una especie del género *Paecilomyces*.

6.5 Estudio químico de *Paecilomyces*

6.5.1 Cultivos en pequeña escala de microorganismos fúngicos

Los microorganismos aislados en cultivo axénico se transfirieron por duplicado a tubos para centrifuga de 50 mL conteniendo 15 mL de caldo papa dextrosa (CPD), para aumentar la cantidad de biomasa y generar un cultivo semilla que sirviera como inóculo de un medio de cultivo de mayor tamaño. Una vez obtenido el preinóculo (5-7 días), el cultivo del microorganismo en CPD se transfirió a un matraz con arroz (12 g) y/o cereal (10 g), con el propósito de aumentar la biomasa y promover la biosíntesis de metabolitos secundarios. Estos cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente con periodos normales de luz-oscuridad por 28 días [23,64,65].

6.5.2 Obtención de extractos orgánicos

Transcurrido el periodo de crecimiento, se preparó el extracto orgánico de los microorganismos de acuerdo con la siguiente metodología: 1) a cada matraz con cultivo se le añadieron 60 mL de una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂-MeOH y con ayuda de una espátula se fragmentó la biomasa. Las muestras se maceraron por 24 h; 2) transcurridas las 24 h, los cultivos se filtraron al vacío y el residuo sólido se lavó con 90 mL de CH₂Cl₂; 3) a las muestras bifásicas resultantes se les añadieron 75 mL de agua destilada y posteriormente se agitaron por 10-15 minutos; 4) las mezclas bifásicas se transfirieron a un embudo de separación para realizar un proceso de partición. Las fracciones orgánicas se concentraron a presión reducida; 5) los extractos orgánicos resultantes se reconstituyeron con 100 mL de una mezcla 1:1 de MeOH-MeCN y se sometieron a un proceso de reparto con 100 mL de hexano. Las mezclas bifásicas se transfirieron a un embudo de separación y la fase de MeOH-MeCN se concentró a presión reducida. Las fracciones hexánicas se descartaron [64,65].

6.6 Estudios de metabolómica

6.6.1 Análisis de redes moleculares

Los estudios de metabolómica se realizaron por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-UV-HRESIMS-MS/MS) de acuerdo con el protocolo descrito por El-Elimat y colaboradores [66]. La separación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo Waters (Waters Corp., MA, EEUU) equipado con un detector DAD, en una columna BEH C₁₈ (Waters Corp., MA, EEUU; 1.7 μm, 2.1 × 100 mm) y empleando un gradiente lineal iniciando con 15 % de MeCN y 85 % de ácido fórmico al 0.1 % en agua, hasta 100 % de MeCN en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. El control del equipo y análisis de datos se realizó con los softwares Empower 3.0® y Excalibur 3.0. El registro de los espectros se realizó en la Universidad de Carolina del Norte en

Greensboro, UNCG, Carolina del Norte, EUA.

El análisis de datos se realizó siguiendo los protocolos descritos en la literatura [66,67]. Brevemente, se comparó el tiempo de retención, el máximo de absorción (UV), el espectro de masas de alta resolución y el patrón de fragmentación (los 10 picos más intensos) utilizando los modos de ionización positivo y negativo derivados del análisis de los perfiles de UPLC-UV-HRESIMS-MS/MS de extractos orgánicos con aquellos obtenidos para estándares de referencia (~400 metabolitos secundarios).

Para el análisis de redes moleculares, los archivos de salida .raw se convirtieron en archivos .mzXML empleando el software RawConverter, incluido en la paquetería de MSFileReader (Thermo), para su posterior análisis utilizando el servidor de la *Global Natural Products Social Molecular Networkig* (GNPS) [68]. Los parámetros utilizados para el análisis se enlistan a continuación:

- Tolerancia de la masa del ion molecular precursor = 0.02 Da
- Tolerancia de la masa de fragmentos iónicos = 0.02 Da
- Puntuación mínima del coseno = 0.7
- Fragmentos mínimos identificados = 6
- Número máximo de nodos conectados = 100
- Tamaño mínimo de los clústeres = 2
- Búsqueda de análogos = positiva
- Puntuación del umbral = 0.7
- Máxima diferencia en masa para la búsqueda de análogos = 100 Da

6.7 Preparación de cultivo en mediana escala y obtención de extractos orgánicos de IQ-023

Para el cultivo en mediana escala, la especie fúngica se cultivó en placas de PDA (x5) por un periodo de 5 días. Posteriormente, el hongo se transfirió a medio líquido CPD (15 mL x 10). Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm durante 5 días, a temperatura ambiente y con ciclos normales de luz-obscuridad. Consecutivamente, cada cultivo se vertió en matraces

Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 12 g de cereal Cheerios® (×10). El periodo de crecimiento se extendió durante 28 días a temperatura ambiente con periodos normales de luz-oscuridad. El extracto orgánico se preparó siguiendo el protocolo previamente descrito [23].

6.7.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de la especie fúngica IQ-023

El fraccionamiento primario de los extractos se realizó mediante cromatografía en columna tipo flash, en un cromatógrafo CombiFlash Rf system (Teledyne ISCO., NE, EEUU), equipado con una bomba binaria y los detectores de arreglo de diodos (DAD, línea amarilla) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD, línea verde). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (RediSep Rf) y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre diferentes mezclas de hexanos, CHCl₃ y MeOH (línea azul). Las condiciones de este análisis se resumen en la **Figura 7** [69].

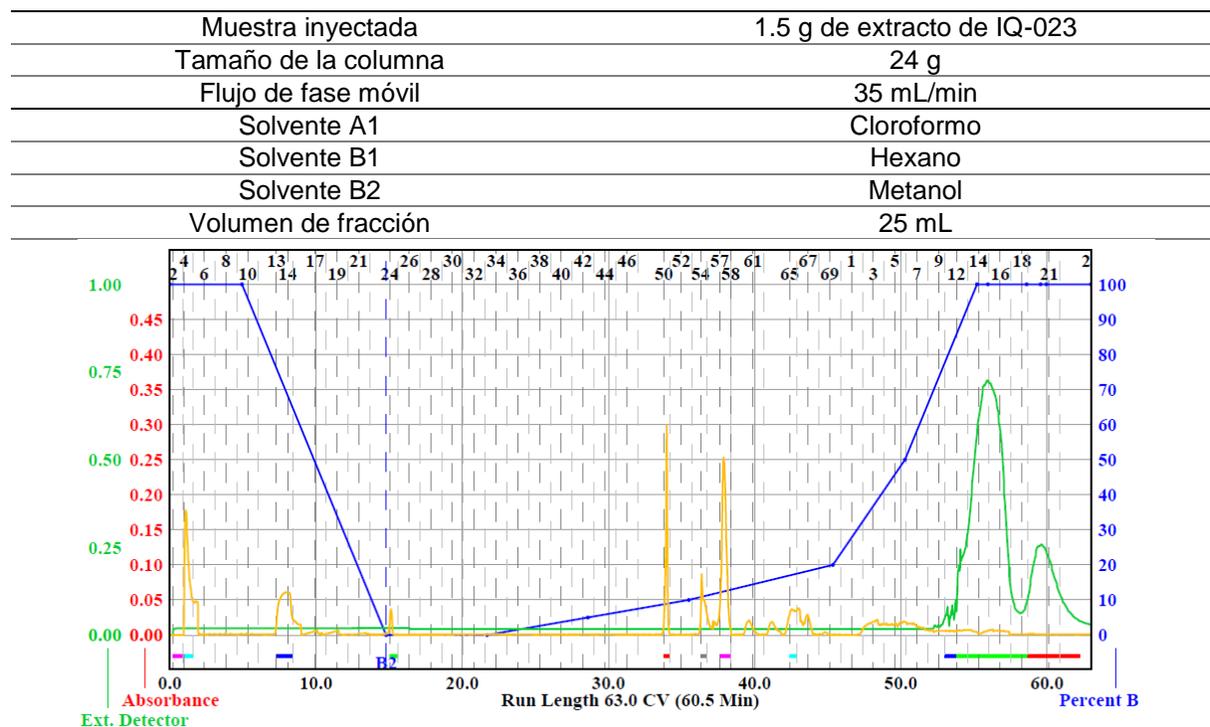


Figura 7. Condiciones cromatográficas del fraccionamiento primario del extracto de IQ-023.

Así, el fraccionamiento primario del extracto orgánico de IQ-023 condujo a la obtención de 13 fracciones primarias. El rendimiento de cada fracción se resume en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Agrupamiento de fracciones primarias del extracto de IQ-023.

Grupo	Fracciones	Código de muestra	Rendimiento (mg)
1	1-10	01001-60-1	38.4
2	11-22	01001-60-2	5.5
3	23-30	01001-60-3	27.3
4	31-48	01001-60-4	61.5
5	49-52	01001-60-5	63.8
6	53-55	01001-60-6	29.8
7	56-59	01001-60-7	44.8
8	60-61	01001-60-8	30.6
9	62-63	01001-60-9	47.6
10	64-67	01001-60-10	59.0
11	68-70	01001-60-11	36.4
12	71-79	01001-60-12	313.7
13	80-102	01001-60-13	427.1
Total			1,181.5

Aislamiento de la militarinona A (71)

El aislamiento y purificación de los componentes presentes en la fracción primaria 01001-60-7 se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en modo analítico y preparativo. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Varian ProStar equipado con un detector de arreglo de diodos. Los análisis a nivel analítico se realizaron en una columna Synergi (5 μ m, 250 \times 4.6 mm) utilizando como fase móvil un gradiente lineal iniciando con 80% de A (MeOH) y 20 % de B (0.1 % ácido fórmico en agua) hasta 100 % de A en 30 minutos, con un flujo de 1.0 mL/min.

El escalamiento de las condiciones analíticas en una columna Synergi (5 μ m, 250 \times 21.2 mm) utilizando como fase móvil las condiciones antes descritas con un flujo de 21.2 mL/min (**Figura 8, Tabla 9**), permitió el aislamiento de 9.1 mg de militarinona A (**71**).

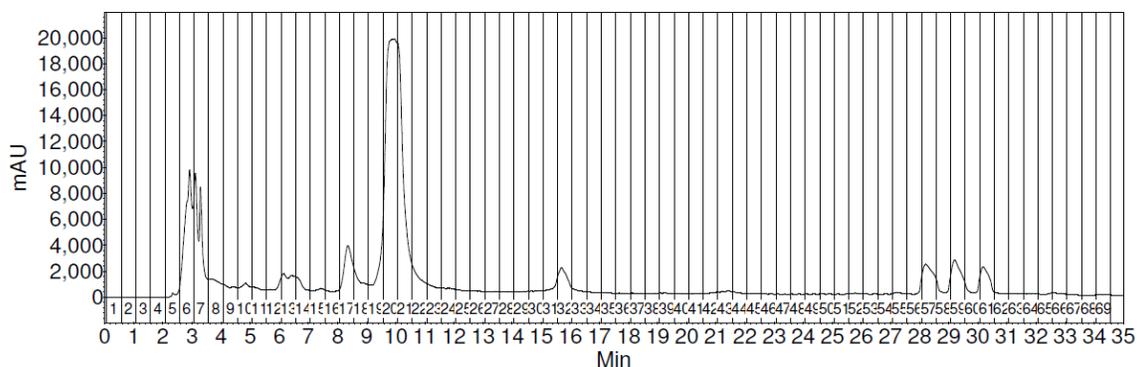


Figura 8. Cromatograma del fraccionamiento secundario preparativo de 01001-60-7.

Tabla 9. Agrupamiento de fracciones del fraccionamiento de 01001-60-7.

Grupo	Fracciones	Código de muestra	Rendimiento (mg)
01	17-18	01001-76-1	1.0
02	19-22	01001-76-2	9.1
03	31-33	01001-76-3	1.0
04	57	01001-76-4	3.3
05	59	01001-76-5	3.7
06	61	01001-76-6	2.7
Total			20.8

6.8 Estudios de acoplamiento molecular

6.8.1 Proteínas

La estructura cristalográfica de la calmodulina se obtuvo del Protein Data Bank (código PDB: 1A29). Las estructuras proteicas usadas en los cálculos de acoplamiento molecular se prepararon en la interfaz gráfica AutoDock Tool 1.5.4 (ADT), en la cual se añadieron los átomos de hidrógeno polares y cargas de Kolleman. Los archivos fueron almacenados en un formato apropiado para su posterior uso en Autogrid4.0 y AutoDock4.0 [61].

6.8.2 Preparación de los ligandos

Los ligandos evaluados en los estudios de acoplamiento molecular se construyeron en el programa Spartan'10 (www.wavefunction.com). La optimización geométrica se realizó usando métodos semiempíricos, con un campo de fuerza PM3, empleando el programa Spartan '10. Posteriormente los ligandos fueron preparados con la asignación de las cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli y la adición de hidrógenos no polares mediante el programa AutoDock 4.2 usando la interfaz ADT 1.5.4 [61].

6.8.3 Acoplamiento molecular (AM, Docking)

La predicción de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó con el programa AutoDock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu/>) empleando un Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). Para la predicción de los sitios y conformaciones de unión de menor energía, inicialmente se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego en una región de búsqueda (*grid*) de 126 × 126 × 126 Å centrada en la proteína. Posteriormente, la conformación de menor energía (menor $\Delta G_{\text{unión}}$) resultante se utilizó como la inicial para llevar a cabo una nueva simulación en una región de búsqueda de 40 × 40 × 40 Å centrada en el ligando. Todas las simulaciones se realizaron con un LGA, un tamaño de población de 150 individuos, 2.5×10^6 evaluaciones energéticas y 100 corridas [61]. Los resultados fueron analizados utilizando la interfaz ADT 1.5.4 (análisis por clúster), PyMol.

6.9 Ensayos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor *hCaM M124C-nBBR*

Los espectros de fluorescencia de la militarinona A (**71**) se adquirieron con un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA) a 25°C, empleando una λ_{ex} de 340 nm y λ_{em} de 410-550 nm. Los datos se registraron a través del software VINCI 1.6.SP4 (Experiment & Instrument Control). Obtenidos los datos, se calculó la k_d del complejo proteína-ligando sustituyendo en la siguiente ecuación:

$$v_0 = \frac{[1 + k_d + (L_0/P_0)] - \sqrt{[1 + (k_d/P_0) + (L_0/P_0)] - 4(L_0/P_0)}}{2}$$

En la cual, P_0 representan a la concentración de la proteína, L_0 al ligando y K_d es la constante de disociación. El análisis de los datos se realizó con el programa Prisma 6.0.

El estudio de apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM en presencia de militarinona A (**71**) se realizó empleando el biosensor fluorescente *hCaM M124C mBBR* a una concentración de 1 μ M en solución amortiguadora de NaOAc 5 mM y 10 mM de CaCl_2 a pH 5.1 siguiendo la metodología descrita por González-Andrade y colaboradores [40,70].

6.10 Evaluación del potencial citotóxico

El potencial citotóxico del extracto orgánico de la especie IQ-023 y el compuesto **71** se evaluó contra las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de mama), MDA-MB-435 (melanoma humano) y OVCAR3 (cáncer de ovario). Las líneas fueron proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, anassas, VA). Para ello, las líneas celulares fueron reactivadas e incubadas a 37 °C en medio líquido RPMI 1640 y 5 % de CO_2 , suplementado con suero fetal bovino (10 %), penicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (100 μ g/mL). Posteriormente, las células en fase log de crecimiento se recuperaron mediante tripsinización en monocapa y sucesivos lavados, para eliminar cualquier remanente enzimático. El ensayo de citotoxicidad consistió en incubar una alícuota equivalente a 5,000 células por pozo, en una placa de 96 pozos a 37 °C y 5 % de CO_2 por 16 h. Al término del periodo de incubación, a cada pozo se le adicionó una alícuota de los productos a evaluar disueltas en DMSO y se realizó una segunda incubación por 72 bajo las mismas condiciones. La viabilidad de las células se cuantificó empleando el kit comercial CellTiter-Blue (Cell Viability Assay, Promega Corp, Madison, WI). Los resultados se reportan como el porcentaje de inhibición a las concentraciones de 2 y 20 μ g/mL para extractos y como concentración inhibitoria media (CI_{50}) para los productos puros [69,71-73].

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio se desarrolló como parte de un programa multidisciplinario de mayor alcance enfocado en el aislamiento de moléculas bioactivas a partir de microorganismos fúngicos, colectados en regiones inexploradas del territorio nacional. La metodología consta de 14 pasos, iniciando con la recolección de los sustratos para la obtención de microorganismos en cultivo axénico (1-3). Posteriormente, los microorganismos se cultivan inicialmente en pequeña escala por un periodo de 28 días (5), mientras se realiza la identificación taxonómica, a través de análisis filogenéticos (4). Transcurrido el periodo de fermentación, se obtiene el extracto orgánico utilizando metodologías convencionales (6). Enseguida, el extracto se evalúa en diferentes ensayos para determinar si éste presenta alguna actividad biológica, y se analiza utilizando técnicas de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (estudios de metabolómica, análisis de redes moleculares) para descartar la presencia de metabolitos secundarios conocidos (priorización de muestras). Subsecuentemente, se reduce la complejidad química del extracto orgánico empleando diversas técnicas cromatográficas hasta obtener los compuestos puros, mismos que se caracterizan mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas (7-11). Una vez identificados los compuestos, se realizan diversos ensayos *in vitro* (12 y 13) e *in silico* (14) para corroborar la actividad biológica y proponer un probable mecanismo de acción (**Figura 9**).

En el presente estudio, el microorganismo IQ-023 (*Paecilomyces* sp.) aislado de un tallo sumergido en agua dulce colectado en el Cerro del Sombrero, Cuauhtepc, Ciudad de México, se cultivó en dos diferentes medios sólidos de cultivo (arroz y Cheerios®) por un periodo de 28 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos normales de luz oscuridad. Transcurrido el periodo de fermentación se preparó el extracto orgánico de acuerdo con el protocolo descrito en la sección experimental. Posteriormente, se evaluó la actividad biológica de los extractos en diversos ensayos *in vitro*, incluyendo inhibición de las enzimas α -glucosidasas de levadura y de mamífero (intestino de rata; Sigma-Aldrich), y su potencial citotóxico contra dos líneas celulares (MDA-MB-435 y MDA-MB-231). Los resultados preliminares de

actividad citotóxica (~100 % de inhibición a 2 y 20 µg/mL; **Figura 10**) motivaron el estudio químico de esta especie.

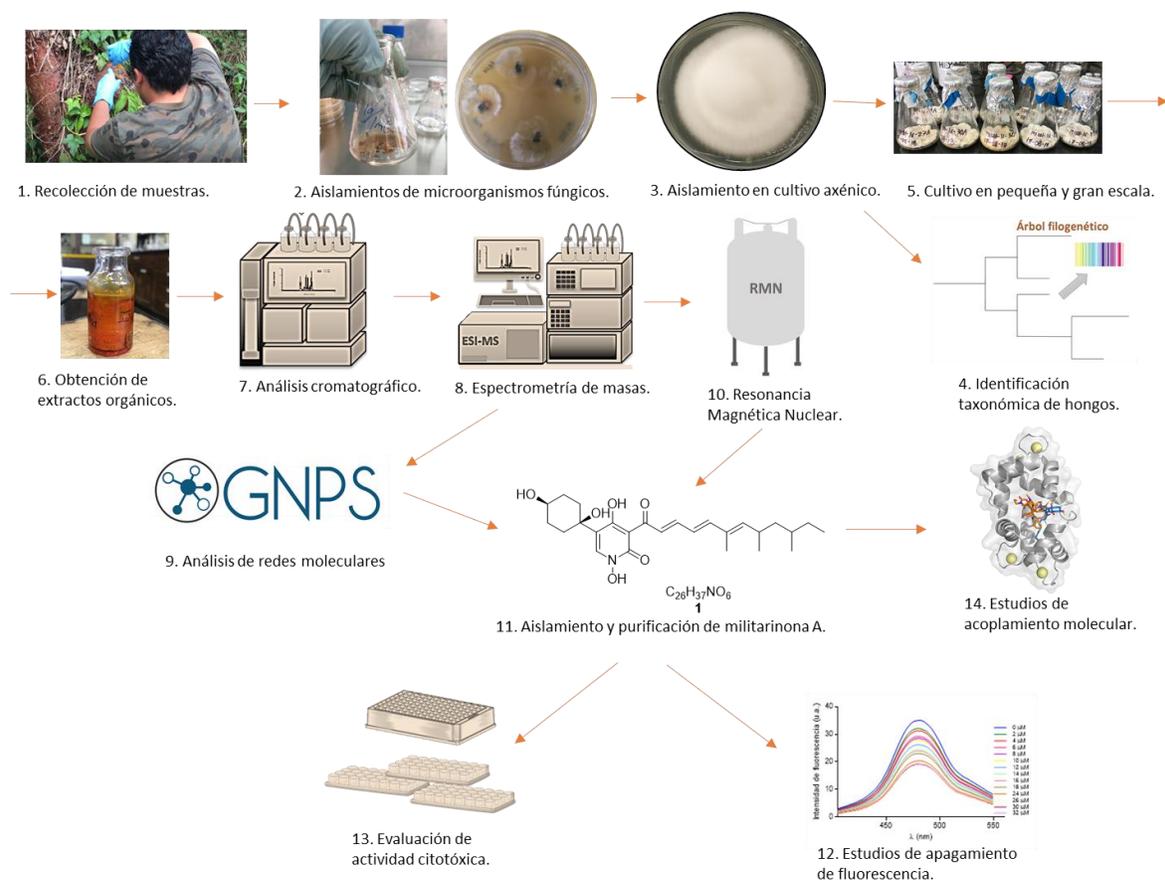


Figura 9. Estrategia general para la obtención de antagonistas de la CaM con actividad citotóxica a partir de microorganismos fúngicos. Se inicia con la recolección de los sustratos para la obtención de microorganismos en cultivo axénico (1-3). Posteriormente, los microorganismos se cultivan en pequeña escala por un periodo de 28 días (5), mientras se realiza la identificación taxonómica de los microorganismos aislados, a través de análisis filogenéticos (4). Transcurrido el periodo de fermentación, se obtiene el extracto orgánico utilizando metodologías convencionales (6). Enseguida, el extracto se fracciona utilizando diferentes técnicas cromatográficas hasta obtener los compuestos puros, que se caracterizan mediante el empleo de técnicas espectroscópicas, espectrométricas y empleando una plataforma de análisis de redes moleculares(7-11). Una vez identificados los compuestos, se realizan diversos ensayos *in vitro* (12 y 13) e *in silico* (14).

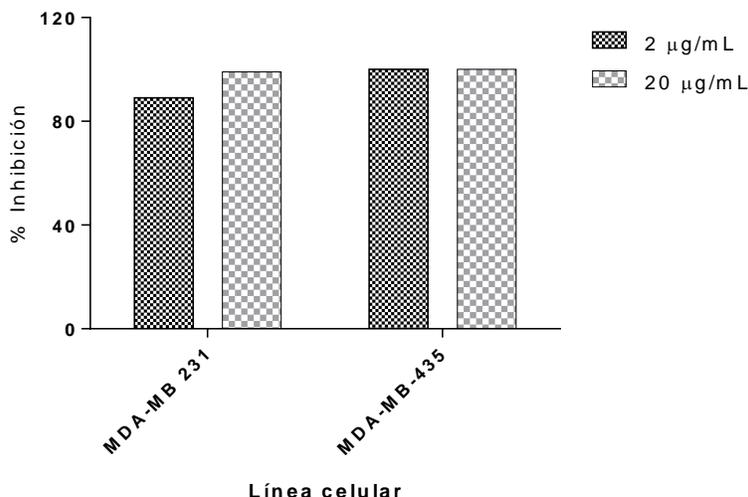
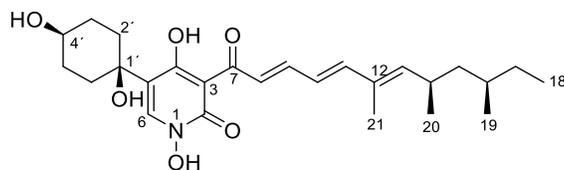


Figura 10. Actividad citotóxica del extracto de IQ-023 sobre las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de pecho) y MDA-MB-435 (melanoma).

El estudio químico inició con el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas de los extractos orgánicos de arroz y Cheerios® del microorganismo (**Figura 11**), mismo que indicó la presencia de un metabolito secundario mayoritario en los dos extractos. Por otra parte, el análisis de redes moleculares de ambos extractos permitió seleccionar el medio sólido Cheerios® como el más adecuado para la expresión de metabolitos secundarios con actividad citotóxica (**Figura 12**).

Así, la reducción de la complejidad química del extracto orgánico de *Paecilomyces* sp. (IQ-023) utilizando cromatografía tipo flash (fase normal), HPLC analítico y preparativo (fase reversa), permitió el aislamiento de la militarinona A (**71**) como el metabolito mayoritario producido por la especie fúngica bajo las condiciones de cultivo [74].



Militarinona A (**71**)

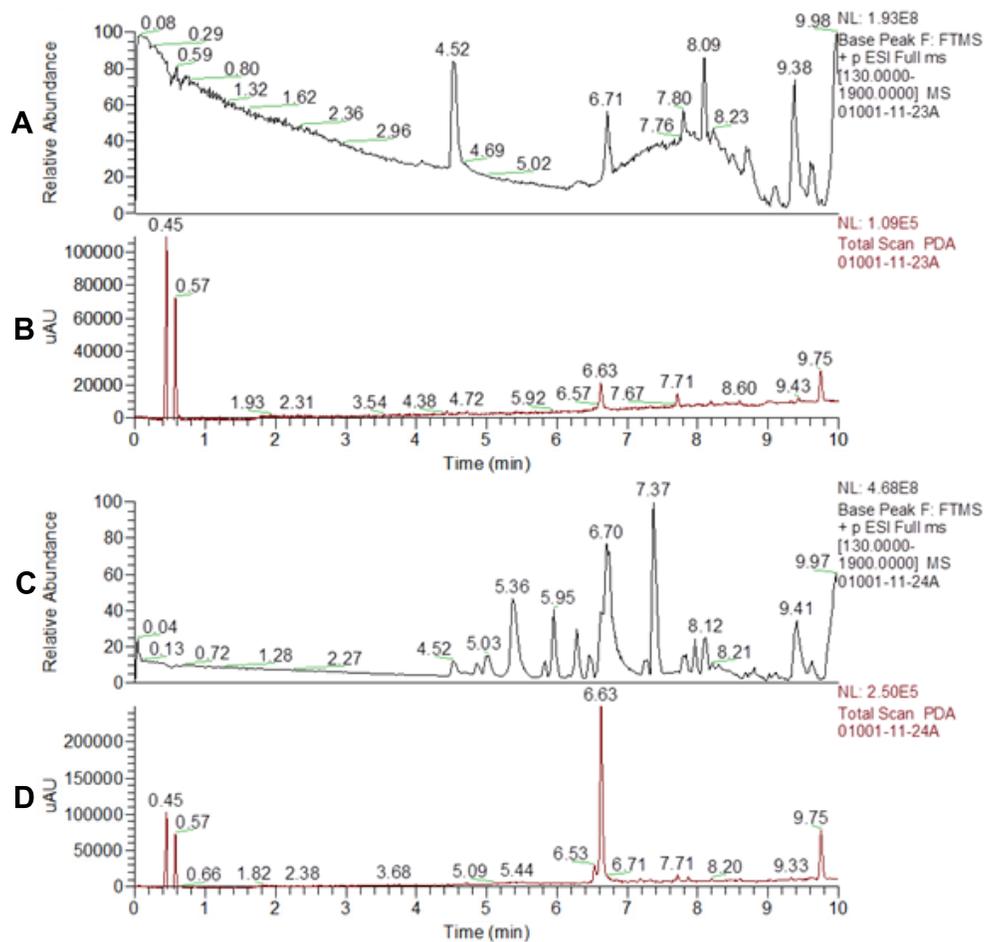


Figura 11. A) y C) Espectros de masas de extractos de IQ-023 en arroz (A) y Cheerios® (C), respectivamente. B) y D) Espectros de UV-Vis. de extractos de IQ-023 en A y C, respectivamente.

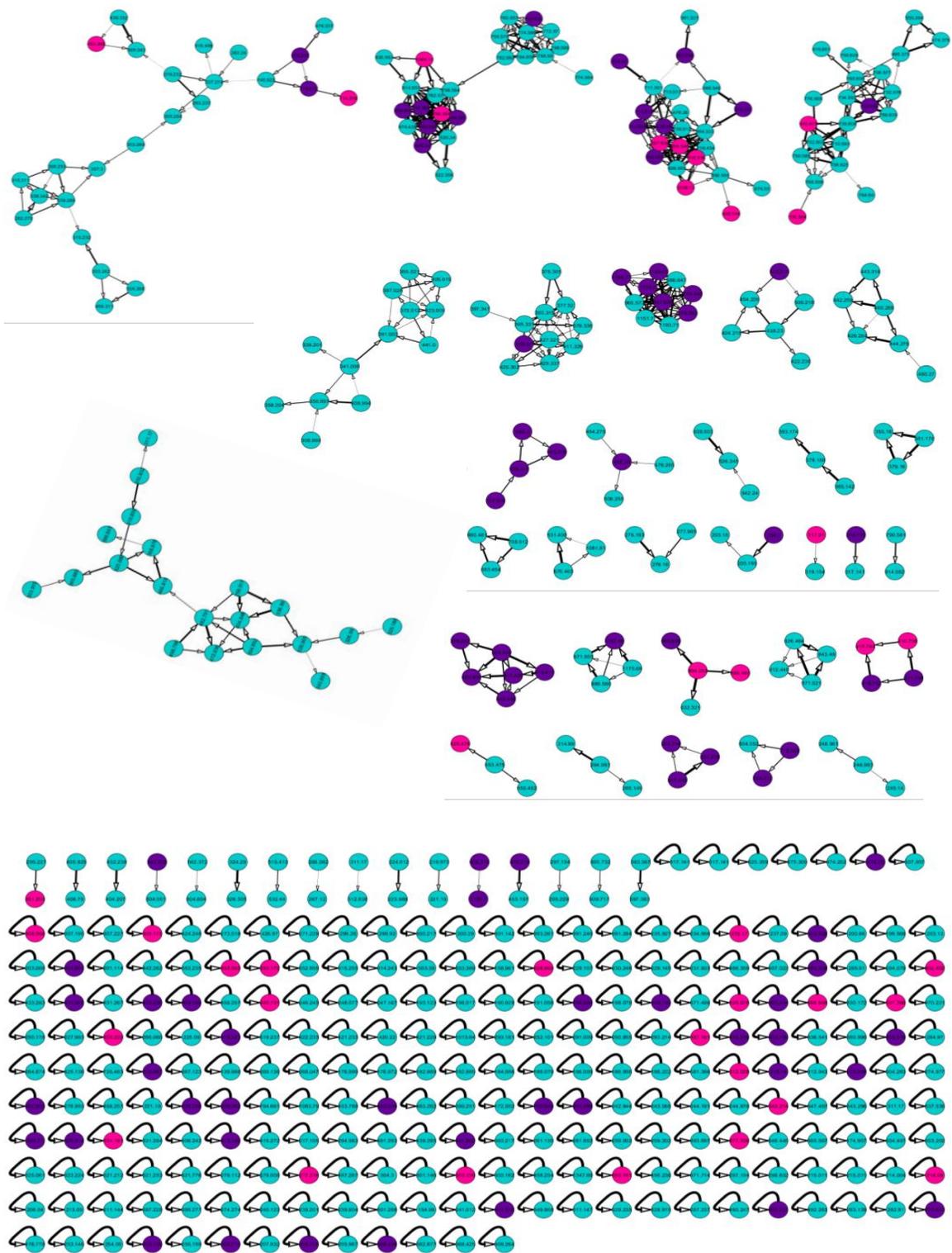


Figura 12. Análisis de redes moleculares. En azul se muestran aquellos nodos en los que convergen espectros de masas de extractos de IQ-023 de cultivos de Cheerios® y arroz. Con morado se representan a los nodos únicos de cereal y con rosa a los nodos únicos de arroz.

La militarinona A (**71**) se aisló como un sólido de color amarillo-naranja. Su fórmula molecular se estableció como $C_{26}H_{37}NO_6$ con base en el ion pseudomolecular $[M+H]^+ = 460.2668$ m/z , calculado para $C_{26}H_{38}NO_6$ (**Figura 13**). Su espectro de UV obtenido del análisis por UPLC-UV mostró máximos de absorción en 220.06 y 396.6 nm (**Figura 14**). El espectro de RMN- 1H (**Figura 15**) en combinación con el experimento HSQC (**Figura 17**), ambos registrados en $CDCl_3$, mostraron señales para 35 hidrógenos, incluyendo:

1. Una señal simple que integra para uno en δ_H 17.69 ppm, correspondiente al protón del enol en posición 4.
2. Seis señales para protones vinílicos en δ_H 7.97 (d), 7.89 (s), 7.23 (dd), 6.75 (d), 6.48 (dd) y 5.56 (d) ppm, asignables a los protones de las posiciones 8, 6, 9, 11, 10 y 13, respectivamente.
3. Una señal doble para un metilo vinílico en δ_H 1.84 ppm, atribuible a los hidrógenos del metilo 21.
4. Dos resonancias dobles en δ_H 0.98 y 0.85 ppm asignables a los metilos de las posiciones 19 y 20.
5. Una señal triple que integra para tres en δ_H 0.83 ppm aplicable al grupo metilo de la posición 18.
6. Dos señales múltiples en δ_H 1.12 y 1.31 ppm que corresponden con los protones de la posición 15.
7. Una resonancia múltiple en δ_H 2.66 ppm asignada al protón de la posición 14.
8. Una señal múltiple atribuida al protón 16 en δ_H 1.24 ppm.
9. Dos resonancias múltiples entre δ_H 1.85-2.03 ppm que integran para 4 asignable a los protones de las posiciones 2', 6' y 3', 5'.
10. Dos señales múltiples entre δ_H 1.16-1.37 ppm que integran para 6 atribuibles a los protones de las posiciones 16, 17, 2', 6' y 3', 5'.
11. Una señal triple de triples en δ_H 3.69 ppm correspondiente al oximetino de la posición 4' (**Tabla10, Figura 15**) [74].

En el espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 16**) se registraron 26 resonancias en δ_{C} 193.7, 174.1, 156.9, 150.0, 148.3, 147.8, 133.0, 131.6, 126.1, 125.4, 117.5, 105.5, 70.6, 70.14, 44.8, 34.4 ($\times 2$), 32.5, 31.1, 30.8 ($\times 2$), 30.2, 21.4, 19.3, 12.6 y 11.4 ppm (**Tabla 10**), asignables a cuatro grupos metilo, seis metilenos, nueve metinos y siete carbonos cuaternarios [74].

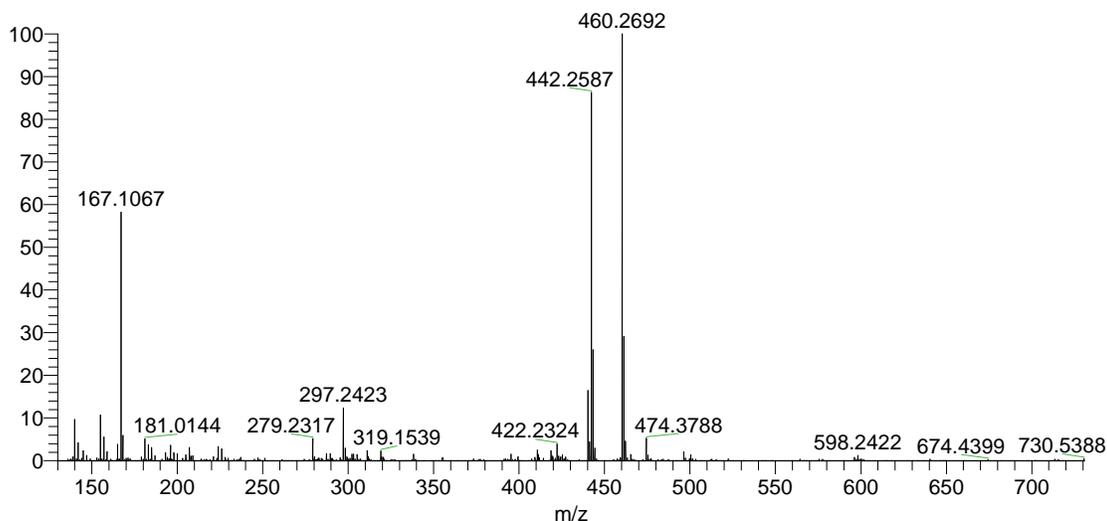


Figura 13. Espectro de masas de alta resolución para la militarinona A (**71**). El espectro se obtuvo por la técnica de electrospray en modo positivo (ESI-MS).

La estructura en 2D de la militarinona A (**71**) se estableció a través del análisis de los espectros de correlación homonuclear (^1H - ^1H COSY) y heteronuclear a larga distancia (^1H - ^{13}C HMBC); **Figuras 19** y **21**. Así, el análisis del espectro COSY permitió identificar los sistemas de spin mostrados en las **Figuras 20a**, **20b**, **20c** y **20d**. La configuración de los dobles enlaces 8-9, 9-10 y 10-11 se establecieron como *E* con base en el análisis de las constantes de acoplamiento entre dichos protones (**Tabla 10**). El sistema de spin 2', 6'-3', 5'-4' en la subestructura **20d** se estableció por la presencia de señales equivalentes para los metilenos de las posiciones 2', 6' y 3', 5', surgiendo la presencia de un anillo de ciclohexano 1,4 disustituido. Por otra parte, el análisis exhaustivo del espectro de HMBC (**Figuras 19** y **21**) permitió ensamblar la estructura de la militarinona A (**71**) como un alcaloide de tipo piridona. Cabe mencionar que los datos de RMN para la militarinona A (**71**) concuerdan con los reportados por Schmidt y colaboradores en 2002 [74].

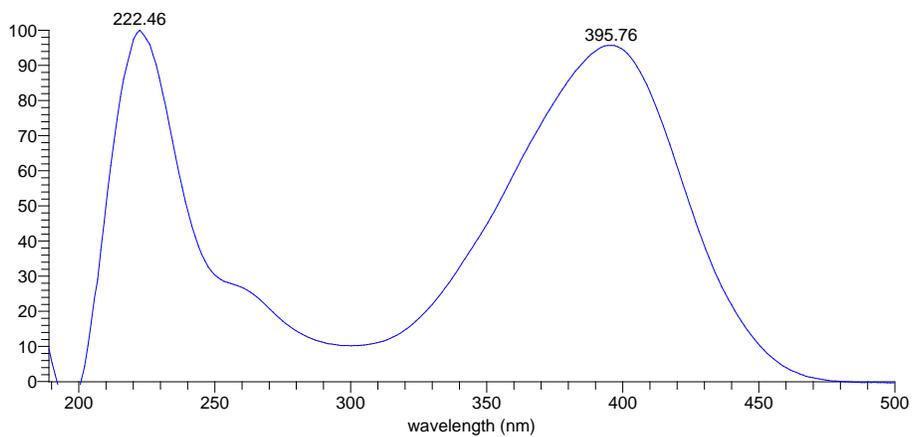


Figura 14. Perfil de UV de la militarinona A (**71**).

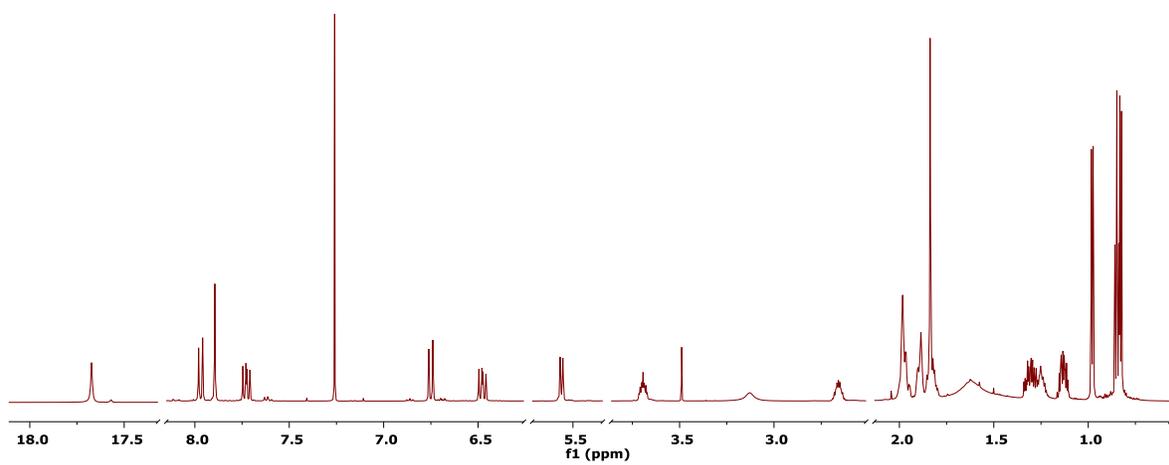


Figura 15. Espectro de RMN-¹H de la militarinona A (**71**), obtenido a 700 MHz en CD₃OD.

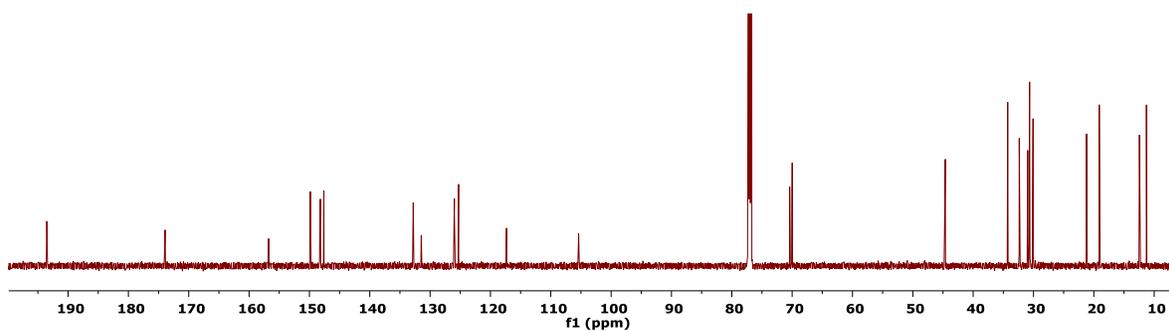


Figura 16. Espectro de RMN-¹³C de la militarinona A (**71**), obtenido a 175 MHz en CD₃OD.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C para la militarinona A (**71**) en CD₃OD (¹H a 700 MHz y ¹³C a 175 MHz).

Posición de carbono	δC	δH	Multiplicidad	J (Hz)
2	156.9			
3	105.5			
4	174.1	17.69	s	
5	117.5			
6	133.0	7.89	s	
7	193.7			
8	126.1	7.97	d	14.9
9	147.8	7.72	dd	14.8, 11.3
10	125.4	6.48	dd	15.1, 11.3
11	150.0	6.75	d	15.1
12	131.6			
13	148.3	5.56	d	9.7
14	31.1	2.66	m	
15a	44.8	1.12	m	
15b		1.31	m	
16	32.5	1.25	m	
17a	30.2	1.12	m	
17b		1.29	m	
18	11.4	0.83	t	7.4
19	19.3	0.85	d	6.5
20	21.4	0.98	d	6.6
21	12.6	1.84	m	
1'	70.6			
2', 6'	34.4	1.97	m	
3', 5'	30.8	1.81, 1.89	m	
4'	70.1	3.69	tt	10.8, 4.4

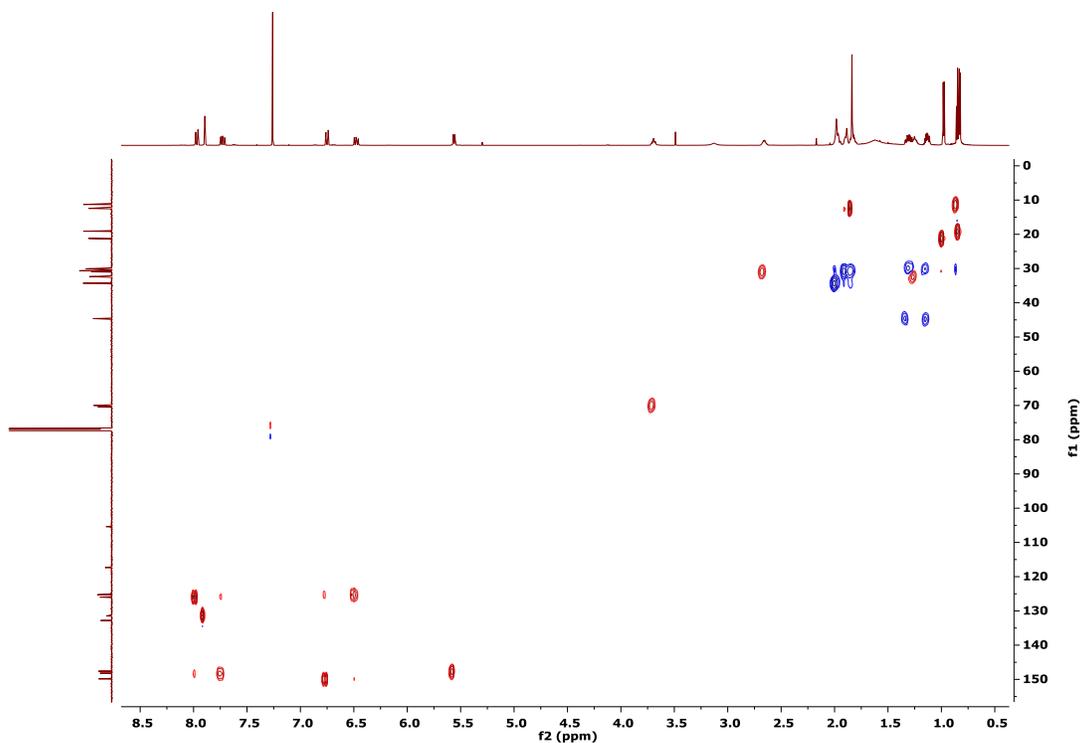


Figura 17. Espectro bidimensional de correlaciones HSQC para la militarinona A (71).

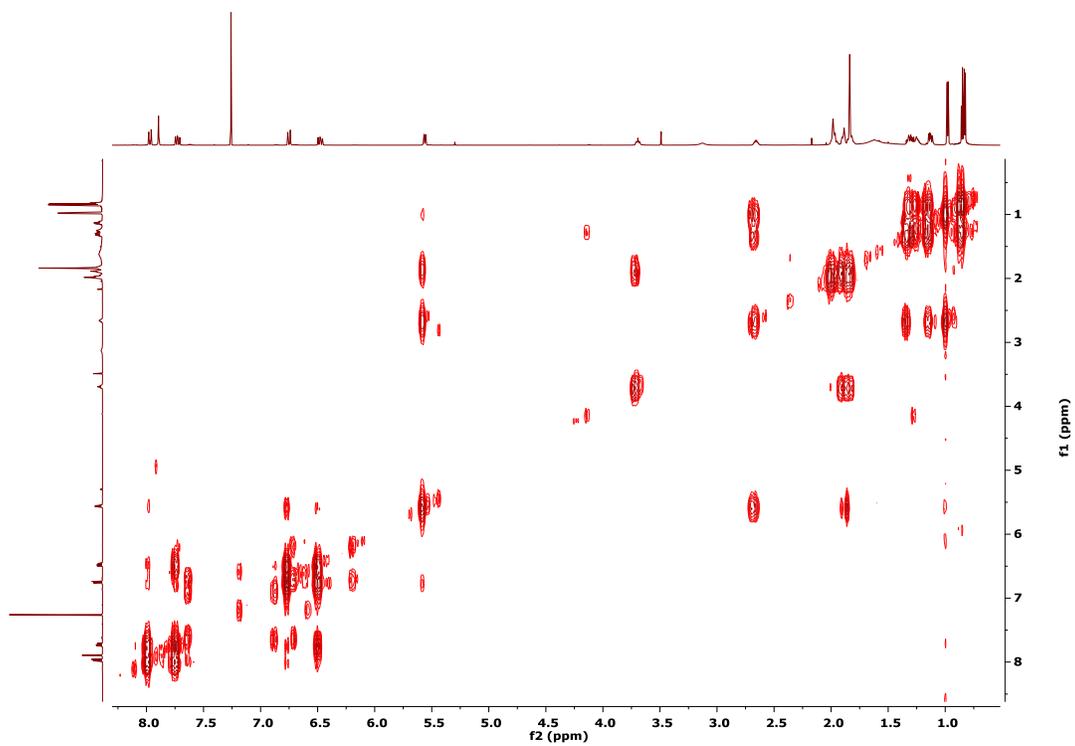


Figura 18. Espectro bidimensional de correlaciones COSY para la militarinona A (71).

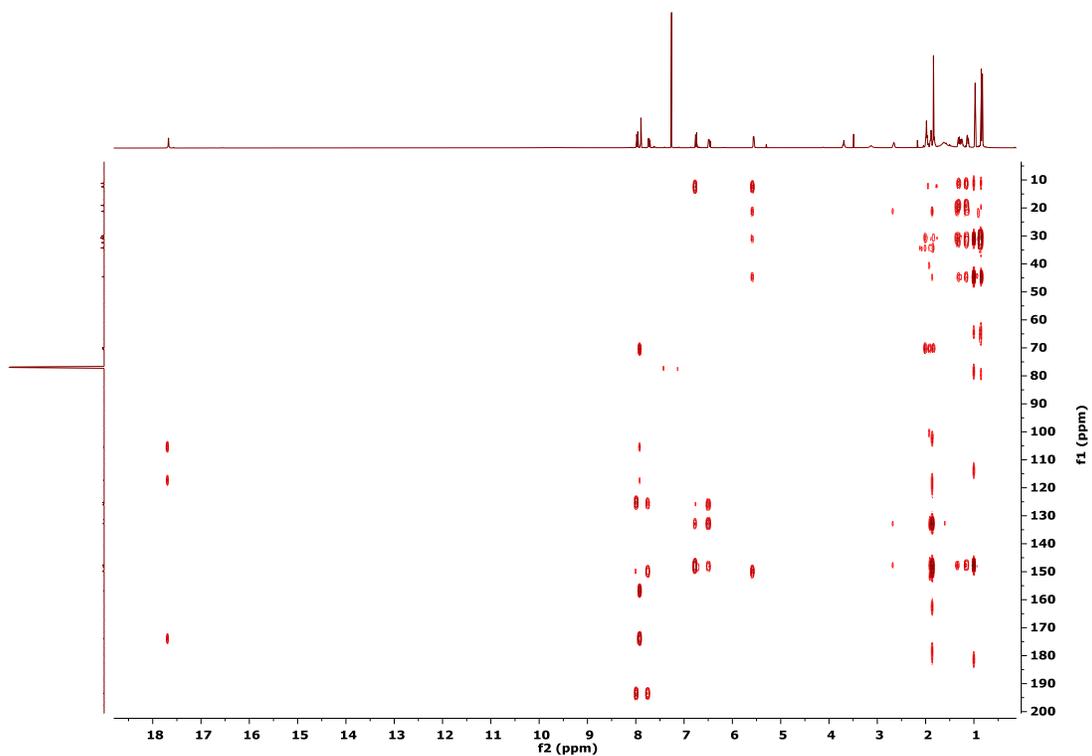


Figura 19. Espectro bidimensional de correlaciones HMBC para la militarinona A (71).

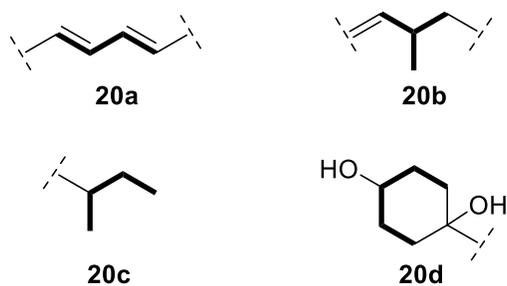


Figura 20. Sistemas de spin que pertenecen a estructuras parciales de la militarinona A (71).

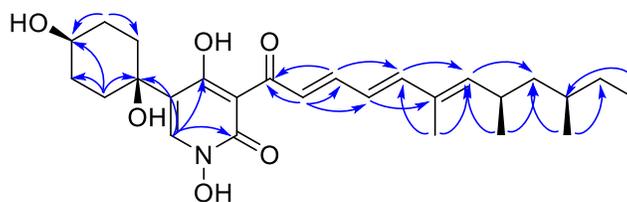


Figura 21. Acoplamiento $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ a 3 y 4 enlaces para la militarinona A (71).

Los alcaloides de tipo piridona representan un grupo muy pequeño de metabolitos de biogénesis mixta. Su biosíntesis involucra la condensación de un residuo de fenilalanina y una cadena de tipo policétido, que resulta en la formación un intermediario del tipo ácido tetrámico, el cual se rearregla, expande, oxida y reduce para generar el producto **71 (Figura 22)** [74,75].

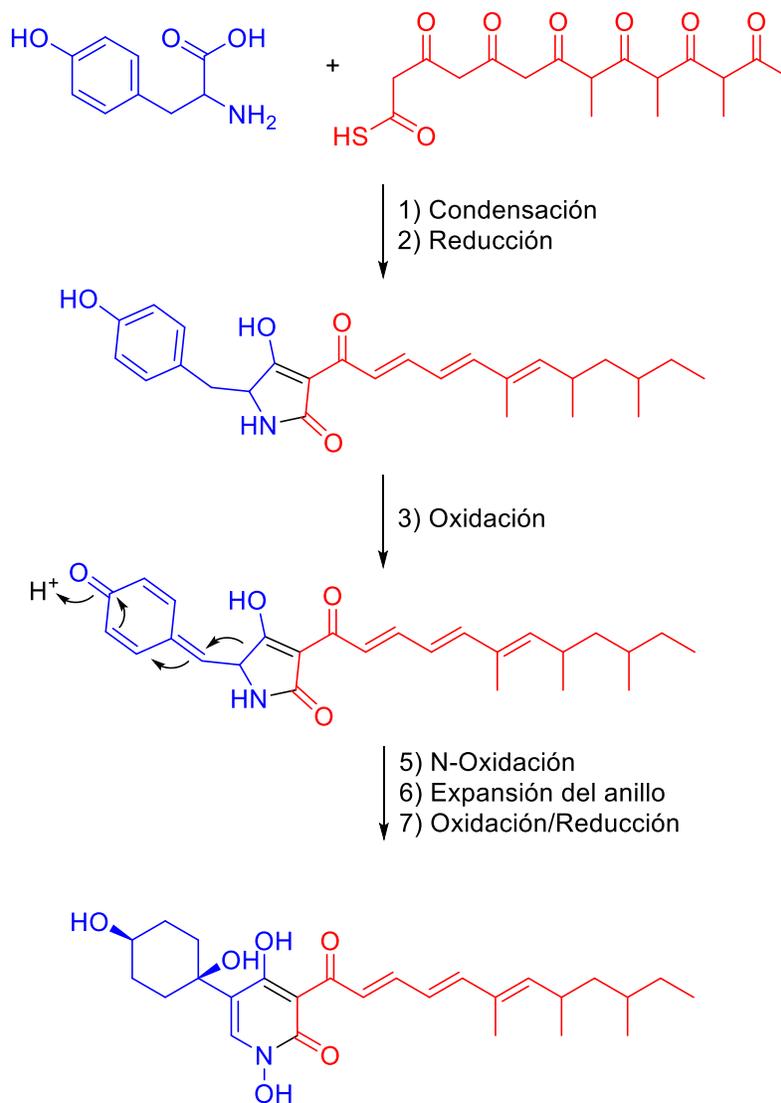


Figura 22. Propuesta biosintética para la formación de la militarinona A (**71**).

Considerando la naturaleza anfipática de la militarinona A (**71**) (una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica) se decidió evaluar su actividad antagónica sobre la proteína CaM. Para ello se utilizó el biosensor fluorescente *hCaM-M124C-mBBr*

[70], el cual presenta ciertas ventajas, entre las que resaltan: la posibilidad de realizar mediciones directas en solución, utilización de una cantidad mínima de muestra, una alta sensibilidad y especificidad de unión, además de que permite realizar determinaciones cuantitativas de los parámetros de unión [70].

La interacción del compuesto **71** con el biosensor provoca cambios conformacionales que se reflejan en un cambio en el microambiente que rodea al fluoróforo, resultando en un apagamiento de la fluorescencia (**Figura 23A**), mismo que se atribuye a la formación del complejo $hCaM-M124C-mBBr-4Ca^{2+}-71$. Los resultados de este ensayo indicaron que **71** se une a la CaM, con una K_d de 412.5 ± 0.25 nM (Figura 5B), tres veces más afín que la clorpromazina (1.25 ± 0.12 μ M), compuesto utilizado como control positivo y comparable con la de algunos metabolitos secundarios de microorganismos fúngicos, tales como: las emodinas de *Aspergillus* sp., las xantonas de *Emericella* 25379, las malbranqueamidas de *Malbranchea aurantiaca* y la chaetomina de *Chaetomium globosum*, por mencionar algunos [30].

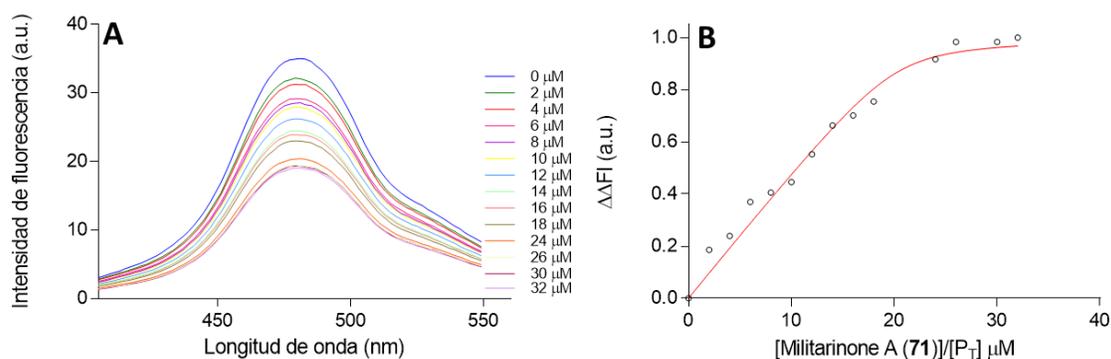


Figura 23. Ensayo de unión de militarinona A (**71**) con la CaM. Espectros de fluorescencia (A) y curva de titulación (cálculo de K_d) (B) del biosensor fluorescente $hCaM-M124C-mBBr$ con concentraciones crecientes de militarinona A (**71**).

Estudios previos señalan que los antagonistas de la CaM presentan actividad antitumoral [76,77]. Esta información, en conjunto con los resultados de unión a la CaM, motivaron la evaluación de **71** como agente citotóxico contra tres líneas celulares tumorales de importancia clínica (MDA-MB-231, MDA-MB-435 y

OVCAR3). Los resultados de esta evaluación permitieron reconocer al compuesto **71** como un excelente agente citotóxico (**Figura 24, Tabla 11**), con concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) en el rango de 1.17-4.08 μM , comparables con la CI_{50} de 1.75 μM reportada para la línea celular A549 (de carcinoma de pulmón) [78]. En este experimento el Taxol®, un producto natural, se utilizó como control positivo.

Tabla 11. Evaluación de la actividad citotóxica de la militarinona A (**71**) contra diversas líneas celulares tumorales.

Compuesto	$CI_{50}(\mu\text{M})$		
	MDA-MB-435	MDA-MB-231	OVCAR3
Militarinona A (71)	1.17	4.08	1.56
Control positivo	$CI_{50}(\text{nM})$		
	MDA-MB-435	MDA-MB-231	OVCAR3
Taxol	0.43	166	5.12

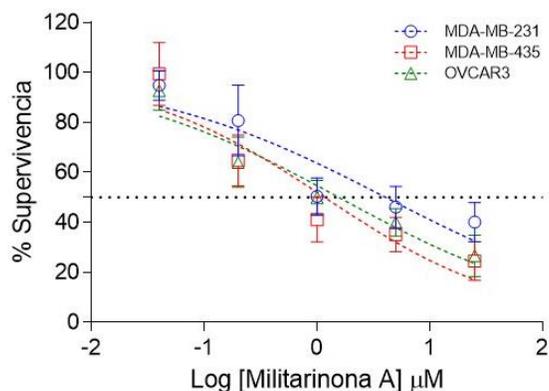


Figura 24. Actividad citotóxica de militarinona A (**71**). Curvas concentración-viabilidad celular de **71** contra las líneas celulares MDA-MB-231 (círculos azules), MDA-MB-435 (cuadros rojos) y OVCAR 3 (triángulos verdes).

Finalmente, con el objetivo de predecir el posible sitio de unión de **71** con la CaM, se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando la estructura cristalográfica de la CaM cocrystalizada con trifluoroperazina (Código PDB: 1A29) como modelo. Los resultados del estudio indicaron que la militarinona A (**71**) se une

a la CaM de manera no clásica, en un sitio similar al del compuesto KAR-2, un compuesto con actividad antitumoral derivado de la vinblastina (**Figura 25 A**) [30].

Los aminoácidos involucrados en la interacción son principalmente hidrofóbicos e incluyen a la Phe¹⁹, Leu³², Ile⁵², Val⁵⁵, Ile⁶³, Phe⁶⁸, Met⁷¹, Met⁷², Arg⁷⁴, Lys⁷⁵, Met⁷⁶ y Met¹⁴⁵. Las fuerzas que gobiernan la interacción incluyen enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo hidrofóbicas [30].

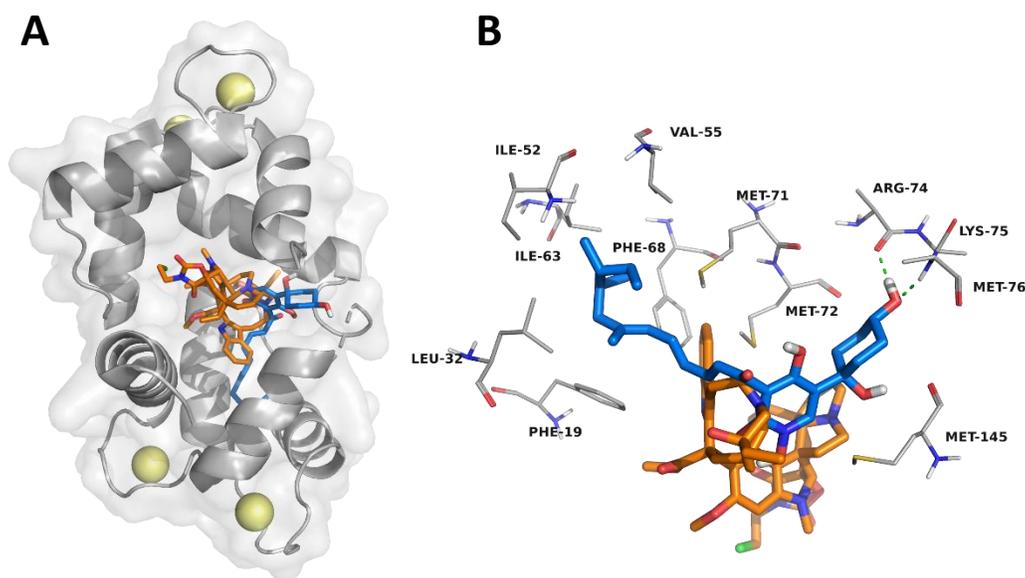


Figura 25. Modelo estructural generado para la militarinona A (71) en complejo con la calmodulina. La figura A muestra el sitio de unión del compuesto 71 (bastones azules) y el fármaco antitumoral KAR-2 (bastones naranjas). La figura B muestra los aminoácidos involucrados en el sitio de unión del compuesto 71 y KAR-2 con la CaM (bastones grises).

En general, los derivados de *N*-hidroxipiridona que se distribuyen en la naturaleza son un grupo de compuestos con una diversidad rica de estructuras y bioactividades [78]. Sin embargo, las *N*-hidroxipiridonas sustituidas con una fracción enoil en C-3 son relativamente raras. La militarinona A (71) pertenece al grupo de las *N*-hidroxipiridonas y se ha aislado anteriormente de *Isaria farinosa* y *Paecilomyces militaris* [74].

Se ha demostrado que la militarinona A (71) y sus análogos son capaces de inducir señalizaciones complejas, tales como PI3-K/PKB, MEK/ERK, p53 y acumulación de especies reactivas de oxígeno, que juntas contribuyen a promover

neuritogénesis [74] y/o apoptosis dependiendo de los niveles de expresión basal de p53 [79]. La mayoría de las moléculas a las cuales se les atribuyen estas propiedades son glicoproteínas que presentan dificultades de atravesar la membrana hematoencefálica; de modo que las moléculas pequeñas no peptídicas con propiedades neuritogénicas que logran llegar al sistema nervioso central son una herramienta valiosa en la investigación de las enfermedades neurodegenerativas [79].

Asimismo, se ha reportado que la fumosorinona (**66**), un análogo estructural de la militarinona A (**71**), es capaz de inhibir a la proteína tirosina fosfatasa 1B [58], que es un blanco molecular prometedor en la prevención y tratamiento de diabetes y obesidad [80]. Además, se ha demostrado que la inhibición de PTP1B podría representar una estrategia terapéutica novedosa en la atención al crecimiento de tumores [80,81], de manera equiparable al enfoque que se ha seguido con las proteínas cinasas de tirosina en la terapia del cáncer.

En resumen, con este trabajo se pone en evidencia el valor de los microorganismos fúngicos que habitan las regiones inexploradas del territorio nacional, como fuente fértil de entidades químicas novedosas con actividad biológica.

En particular, las especies del género *Paecilomyces* se proyectan como una mina de oportunidades para buscar agentes útiles en la terapéutica del cáncer. Es importante subrayar que la información generada en este proyecto constituye el primer reporte de la actividad antagónica de la militarinona A (**71**) sobre la CaM, y permite proponer este mecanismo como la vía por la que ejerce su notable actividad citotóxica. Por lo tanto, surge la pertinencia de estudiar a aquellos análogos estructurales de militarinona A (**71**) como agentes inhibidores de CaM, citotóxicos y antitumorales; así como a las especies del género *Paecilomyces* y/o relacionadas con ésta.

8. CONCLUSIONES

- A partir de un tallo sumergido en agua dulce de la Sierra de Guadalupe, se logró aislar al hongo identificado con la clave IQ-023, caracterizado taxonómicamente como perteneciente al género *Paecilomyces*.
- Se pone de manifiesto el valor inapreciado de las regiones inexploradas del territorio nacional como fuente de microorganismos de importancia médica.
- Se aisló y elucidó al compuesto mayoritario, conocido como militarinona A (**71**).
- La militarinona A (**71**) presenta actividad antagónica sobre CaM con una K_d de 412.5 ± 0.25 nM.
- La militarinona A (**71**) posee actividad citotóxica sobre las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de pecho), MDA-MB-435 (melanoma) y OVCAR3 (cáncer de ovario), con CI_{50} de 4.08, 1.17 y 1.56 (μ M), respectivamente.
- Los estudios de acoplamiento molecular indicaron que la militarinona A (**71**) se une a la CaM de manera no clásica, compartiendo el sitio de unión con el compuesto KAR-2, un agente antitumoral derivado de la vinblastina.

9. PERSPECTIVAS

- Se elucidarán los compuestos minoritarios aislados del extracto de *Paecilomyces* sp.
- Se plantea la búsqueda de análogos estructurales en especies del género *Paecilomyces* y/o relacionadas con ésta, que prometan ser inhibidores de CaM, citotóxicos y antitumorales.
- Se emplearán estrategias que promuevan la expresión de genes silenciados de *Paecilomyces* sp., con el fin de obtener metabolitos secundarios nuevos con actividad biológica.

10. REFERENCIAS

1. Hassanpour, S. H., and Dehghani, M. (2017) *Journal of Cancer Research and Practice* **4**, 127-129
2. Institute, N. C. (2015) National Cancer Institute, What Is Cancer? Differences between Cancer Cells and Normal Cells. in *National Cancer Institute*
3. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018) *CA: Cancer J. Clin.* **68**, 394-424
4. Organization, W. H. (2019) The Global Cancer Observatory.
5. Institute, N. C. (2015) National Cancer Institute, Cancer Treatment Research Why Cancer Treatment Research Is Critical to Progress against the Disease Opportunities. in *Role in Cancer Treatment Research*
6. Urruticoechea A., Alemany R., Balart J., Villanueva A., Viñals F., and Capellá G. (2010) *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3-10
7. Kurnit, K. C., Bailey, A. M., Zeng, J., Johnson, A. M., Shufean, M. A., Brusco, L., Litzemberger, B. C., Sanchez, N. S., Khotetskaya, Y. B., Holla, V., Simpson, A., Mills, G. B., Mendelsohn, J., Bernstam, E., Shaw, K., and Meric-Bernstam, F. (2017) *Cancer Res.* **77**, e123-e126
8. Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K. M. (2000) *Nat. Prod. Rep.* **17**, 215-234
9. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2004) *Curr. Med. Chem.* **11**, 1693-1713
10. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2007) *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477
11. Newman, D. J. (2008) *J. Med. Chem.* **51**, 2589-2599
12. Newman, D., and Cragg, G. (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2120
13. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2009) *Future Med. Chem.* **1**, 1415-1427
14. Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., and Quinn, R. J. (2015) *Nat. Rev. Drug. Discov.* **14**, 111-129
15. Kinghorn, A. D., De Blanco, E. J. C., Lucas, D. M., Rakotondraibe, H. L., Orjala, J., Soejarto, D. D., Oberlies, N. H., Pearce, C. J., Wani, M. C., Stockwell, B. R., Burdette, J. E., Swanson, S. M., Fuchs, J. R., Phelps, M. A., Xu, L., Zhang, X., and Shen, Y. Y. (2016) *Anticancer Res.* **36**, 5623-5637
16. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016) *J. Nat. Prod.* **79**, 629-661
17. Amirkia, V., and Heinrich, M. (2015) *Front. Pharmacol.* **6**, 1-8
18. Koehn, F. E., and Carter, G. T. (2005) *Nat. Rev. Drug. Discov.* **4**, 206-220
19. David, B., Wolfender, J.-L., and Dias, D. A. (2015) *Phytochem. Rev.* **14**, 299-315
20. Amedei, A., and Elios, M. M. D. (2012) *Curr. Med. Chem.* **19**, 3822-3840
21. Hawksworth, D. L., and Lücking, R. (2017) *Microbiol. Spectr.* **5**, 1-17
22. Pearce, C. (2011) *J. Ad. Pharm. Technol. Res.* **2**, 136-137
23. Rivera-Chávez, J., Raja, H. A., Graf, T. N., Gallagher, J. M., Metri, P., Xue, D., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2017) *RSC Advances* **7**, 45733-45741
24. Ito, T., Odake, T., Katoh, H., Yamaguchi, Y., and Aoki, M. (2011) *J. Nat. Prod.* **74**, 983-988

25. González-Medina, M., Prieto-Martínez, F. D., Naveja, J. J., Méndez-Lucio, O., El-Elimat, T., Pearce, C. J., Oberlies, N. H., Figueroa, M., and Medina-Franco, J. L. (2016) *Future Med. Chem.* **8**, 1399-1412
26. Cragg, G. M., Grothaus, P. G., and Newman, D. J. (2009) *Chem. Rev.* **109**, 3012-3043
27. Berchtold, M. W., and Villalobo, A. (2014) *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 398-435
28. Finn, B. E., and Forsén, S. (1995) *Structure* **3**, 7-11
29. Hudmon, A., and Schulman, H. (2002) *Biochem. J.* **364**, 593-611
30. Mata, R., Figueroa, M., Gonzalez-Andrade, M., Rivera-Chavez, J. A., Madariaga-Mazon, A., and Del Valle, P. (2015) *J. Nat. Prod.* **78**, 576-586
31. Xia, Z., and Storm, D. R. (2005) *Nat. Rev. Neurosc.* **6**, 267
32. Vogel, H. J. (1994) *Biochem. Cell Biol.* **72**, 357-376
33. Shim, J. S., Lee, J., Kim, K. N., and Kwon, H. J. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 747-751
34. Wang, Z., Li, S., Shi, Q., Yan, R., Liu, G., and Dai, K. (2010) *Thromb. Res.* **125**, 340-350
35. Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M. C., Lira-Rocha, A., and Mata, R. (2006) *Tetrahedron* **62**, 1817-1822
36. Figueroa, M., Gonzalez Mdel, C., Rodriguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., Gonzalez-Andrade, M., Cerda-Garcia-Rojas, C. M., and Mata, R. (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2167-2174
37. Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., González, M. d. C., Glenn, A. E., Cerda-García-Rojas, C. M., and Mata, R. (2013) *J. Nat. Prod.* **76**, 1454-1460
38. Leyte-Lugo, M., González-Andrade, M., González, M. d. C., Glenn, A. E., Cerda-García-Rojas, C. M., and Mata, R. (2012) *J. Nat. Prod.* **75**, 1571-1577
39. Leyte-Lugo, M., Figueroa, M., González, M. d. C., Glenn, A. E., González-Andrade, M., and Mata, R. (2013) *Phytochemistry* **96**, 273-278
40. Gonzalez-Andrade, M., Del Valle, P., Macias-Rubalcava, M. L., Sosa-Peinado, A., Del Carmen Gonzalez, M., and Mata, R. (2013) *Chemistry and Biodiversity* **10**, 328-337
41. Mata, R., Gamboa, A., Macias, M., Santillan, S., Ulloa, M., and Gonzalez Mdel, C. (2003) *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4559-4562
42. Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., Toriello, C., and Mata, R. (2014) *Planta Med.* **80**, PC17
43. Mosadeghzad, Z., Zuriati, Z., Asmat, A., Gires, U., Wickneswari, R., Pittayakhajonwut, P., and Farahani, G. H. N. (2013) *Chem. Nat. Comp.* **49**, 621-625
44. Wu, H.-Y., Wang, Y.-L., Tan, J.-L., Zhu, C.-Y., Li, D.-X., Huang, R., Zhang, K.-Q., and Niu, X.-M. (2012) *J. Agric. Food Chem.* **60**, 5604-5608
45. Elbandy, M., Shinde, P. B., Hong, J.-K., Bae, K.-S., Kim, M., Lee, S.-M., and Jung, J. H. (2009) *Bull. Korean Chem. Soc.* **30**, 188-192
46. Xu, L., Wu, P., Xue, J., Molnar, I., and Wei, X. (2017) *J. Nat. Prod.* **80**, 2215-2223
47. Mioso, R., Marante, F. J. T., and De Laguna, I. H. B. (2015) *Appl. Biochem. Biotech.* **177**, 781-791

48. Liu, J., Li, F., Kim, E. L., Li, J. L., Hong, J., Bae, K. S., Chung, H. Y., Kim, H. S., and Jung, J. H. (2011) *J. Nat. Prod.* **74**, 1826-1829
49. Petersen, F., Fredenhagen, A., Mett, H., Lydon, N. B., Delmendo, R., Jenny, H.-B., and Peter, H. H. (1995) *J. Antibiot. (Tokyo)*. **48**, 191-198
50. Bilal, S., Ali, L., Khan, A. L., Shahzad, R., Asaf, S., Imran, M., Kang, S.-M., Kim, S.-K., and Lee, I.-J. (2018) *Arch. Microbiol.* **200**, 1493-1502
51. Nam, K. S., Jo, Y. S., Kim, Y. H., Hyun, J. W., and Kim, H. W. (2001) *Life Sci.* **69**, 229-237
52. Putri, S. P., Kinoshita, H., Ihara, F., Igarashi, Y., and Nihira, T. (2009) *J. Nat. Prod.* **72**, 1544-1546
53. Wen, L., Chen, G., She, Z., Yan, C., Cai, J., and Mu, L. (2010) *Russ. Chem. Bull.* **59**, 1656-1659
54. Cheng, Y., Schneider, B., Riese, U., Schubert, B., Li, Z., and Hamburger, M. (2004) *J. Nat. Prod.* **67**, 1854-1858
55. Cheng, Y., Schneider, B., Riese, U., Schubert, B., Li, Z., and Hamburger, M. (2006) *J. Nat. Prod.* **69**, 436-438
56. Lang, G., Blunt, J. W., Cummings, N. J., Cole, A. L., and Munro, M. H. (2005) *J. Nat. Prod.* **68**, 810-811
57. Schmidt, K., Riese, U., Li, Z., and Hamburger, M. (2003) *J. Nat. Prod.* **66**, 378-383
58. Liu, Z.-Q., Liu, T., Chen, C., Li, M.-Y., Wang, Z.-Y., Chen, R.-s., Wei, G.-x., Wang, X.-y., and Luo, D.-Q. (2015) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **285**, 61-70
59. Isaka, M., Palasarn, S., Lapanun, S., and Sriklung, K. (2007) *J. Nat. Prod.* **70**, 675-678
60. Rivera-Chávez, J., Figueroa, M., González, M. d. C., Glenn, A. E., and Mata, R. (2015) *J. Nat. Prod.* **78**, 730-735
61. Rivera-Chavez, J., Gonzalez-Andrade, M., Gonzalez Mdel, C., Glenn, A. E., and Mata, R. (2013) *Phytochemistry* **94**, 198-205
62. Choi, J., and Kim, S.-H. (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 9391-9396
63. Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2017) *J. Nat. Prod.*, 10.1021/acs.jnatprod.1026b01085
64. Rivera-Chávez, J., Caesar, L. K., Garcia-Salazar, J. J., Raja, H. A., Cech, N. B., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2019) *Tetrahedron Lett.* **60**, 594-597
65. Rivera-Chavez, J., El-Elimat, T., Gallagher, J. M., Graf, T. N., Fournier, J., Panigrahi, G. K., Deep, G., Bunch, R. L., Raja, H. A., and Oberlies, N. H. (2019) *Planta Med.* **85**, 62-71
66. El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B. M., Cech, N. B., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2013) *J. Nat. Prod.* **76**, 1709-1716
67. Paguigan, N. D., El-Elimat, T., Kao, D., Raja, H. A., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2017) *J. Antibiot. (Tokyo)*. **70**, 553-561
68. Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapon, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crusemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R. D., Pace, L. A., Quinn, R. A., Duncan, K. R., Hsu, C.-C., Floros, D. J., Gavilan, R. G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R. J., Parrot, D., Carlson, E. E., Aigle, B., Michelsen, C. F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund,

- A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B. T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R. A., Sims, A. C., Johnson, A. R., Sidebottom, A. M., Sedio, B. E., Klitgaard, A., Larson, C. B., Boya P, C. A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D. J., Silva, D. B., Marques, L. M., Demarque, D. P., Pociute, E., O'Neill, E. C., Briand, E., Helfrich, E. J. N., Granatosky, E. A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J. J., Zeng, Y., Vorholt, J. A., Kurita, K. L., Charusanti, P., McPhail, K. L., Nielsen, K. F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M. F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O. B., Baric, R., Silva, R. R., Mascuch, S. J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P. G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A. M. C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B. M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J. E., Metz, T. O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K. M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P. R., Palsson, B. Ø., Pogliano, K., Linington, R. G., Gutiérrez, M., Lopes, N. P., Gerwick, W. H., Moore, B. S., Dorrestein, P. C., and Bandeira, N. (2016) *Nat. Biotech.* **34**, 828
69. Rivera-Chávez, J., Raja, H. A., Graf, T. N., Burdette, J. E., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2017) *J. Nat. Prod.* **80**, 1883-1892
70. González-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., and Sosa-Peinado, A. (2009) *Anal. Biochem.* **387**, 64-70
71. Ayers, S., Graf, T. N., Adcock, A. F., Kroll, D. J., Shen, Q., Swanson, S. M., Matthew, S., Carcache de Blanco, E. J., Wani, M. C., Darveaux, B. A., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2012) *J. Antibiot. (Tokyo)*. **65**, 3-8
72. El-Elimat, T., Figueroa, M., Raja, H. A., Graf, T. N., Swanson, S. M., Falkinham, J. O., 3rd, Wani, M. C., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2015) *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 109-121
73. Figueroa, M., Graf, T. N., Ayers, S., Adcock, A. F., Kroll, D. J., Yang, J., Swanson, S. M., Munoz-Acuna, U., Carcache de Blanco, E. J., Agrawal, R., Wani, M. C., Darveaux, B. A., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2012) *J. Antibiot. (Tokyo)*. **65**, 559-564
74. Schmidt, K., Gunther, W., Stoyanova, S., Schubert, B., Li, Z., and Hamburger, M. (2002) *Org. Lett.* **4**, 197-199
75. Tanabe, M., and Urano, S. (1983) *Tetrahedron* **39**, 3569-3574
76. Horvath, I., Harmat, V., Perczel, A., Palfi, V., Nyitray, L., Nagy, A., Hlavanda, E., Naray-Szabo, G., and Ovadi, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 8266-8274
77. Orosz, F., Vertessy, B. G., Salerno, C., Crifo, C., Capuozzo, E., and Ovadi, J. (1997) *Br. J. Exp. Pathol.* **121**, 955-962
78. Ma, C., Li, Y., Niu, S., Zhang, H., Liu, X., and Che, Y. (2011) *J. Nat. Prod.* **74**, 32-37
79. Kuenzi, P., Kiefer, S., Koryakina, A., and Hamburger, M. (2008) *Apoptosis* **13**, 364-376
80. Krishnan, N., Koveal, D., Miller, D. H., Xue, B., Akshinthala, S. D., Kragelj, J., Jensen, M. R., Gauss, C. M., Page, R., Blackledge, M., Muthuswamy, S. K., Peti, W., and Tonks, N. K. (2014) *Nat Chem. Biol.* **10**, 558-566

81. Wiesmann, C., Barr, K. J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D. A., Shen, W., Fahr, B. J., Zhong, M., Taylor, L., Randal, M., McDowell, R. S., and Hansen, S. K. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 730-737
82. Yang, J. L., Xiao, W., He, H. X., Zhu, H. X., Wang, S. F., Cheng, K. D., and Zhu, P. (2008) *Acta Pharm. Sin. B* **43**, 421-426

Anexo 1

Publicación



Memoria del 46.º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Productos naturales de origen fúngico, una fuente potencial de ligantes de calmodulina con actividad citotóxica.

Fungal natural products as a source of calmodulin ligands with cytotoxic activity.

Rivera-Chávez, José^{1*}; Aguilar-Ramírez, Enrique¹; Morales-Jiménez, Jesús² y González-Andrade, Martín³

1. Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM.
2. CONACYT-CIIDZA y División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.
3. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

*Correspondencia. Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM, Av. Universidad 3000, Col. Copilco, Coyoacán, CDMX, CP 04510 Tel. +52 (55) 5622-4450, jrivera@iquimica.unam.mx

Resumen

La calmodulina (CaM) es considerada la principal proteína reguladora de calcio en células eucariotes. Esta proteína juega un papel muy importante en la transducción de señales intracelulares de calcio, y por lo tanto, regula numerosos procesos fisiológicos y patológicos. En el cáncer, por ejemplo, la CaM se encuentra implicada en el desarrollo y progresión de tumores. En este contexto, el presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un programa multidisciplinario encaminado a la obtención de antagonistas de la CaM de origen natural (metabolitos secundarios de hongos microscópicos) con actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales. Así, el estudio químico de la especie *Paecilomyces* sp. permitió el aislamiento de la militarinona A (**1**). El producto **1** se caracterizó utilizando diversas técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Estudios de apagamiento de la fluorescencia extrínseca, utilizando el biosensor *hCaM-M124C-mBBr*, indicaron que el producto **1** se une de manera directa a la CaM; la magnitud de la constante de disociación se encuentra en el orden de concentraciones nanomolares. Estudios de citotoxicidad *in vitro* contra diversas líneas celulares (MDA-MB-231, MDA-MB-435 y OVCAR3) indicaron que el compuesto **1** es un excelente agente

Abstract

Calmodulin (CaM) is the main Ca²⁺ binding protein in eukaryotic cells. It plays a key role in several physiological and pathophysiological processes. In cancer, for example, this protein is involved in the development and progression of tumors. For this reason, CaM represents itself as an excellent target for the advancement of antitumor drug research. In this context, this work was developed as a part of a multidisciplinary project aimed at the discovery of CaM antagonists from fungi. The study describes the isolation, chemical identification and characterization of the anti-CaM properties of militarinone A (**1**), a secondary metabolite isolated from *Paecilomyces* sp. Compound **1** was elucidated using a set of spectroscopic and spectrometric techniques. The anti-CaM properties of **1** were characterized by using the fluorescent biosensor *hCaM-M124C-mBBr* in a quenching experiment. The results indicated that **1** binds to CaM with a K_d in the nanomolar order. Furthermore, compound **1** exhibited cytotoxic activity when screened *in vitro* against a panel of cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-435 and OVCAR3). Finally, molecular docking studies indicated that militarinone A (**1**) binds to CaM in a pocket similar to that reported for KAR-2 (an antitumor molecule with potent activity), supporting its cytotoxic activity.

citotóxico. Finalmente, los estudios de acoplamiento molecular permitieron proponer que el compuesto 1 se une a la CaM de manera no clásica en un sitio similar al del antitumoral KAR-2, un derivado semisintético del antitumoral vinblastina.

Palabras clave: calmodulina, cáncer, biosensor fluorescente, militarinona A, *Paecilomyces sp.*

Key words: calmodulin, cancer, fluorescent biosensor, militarinone A, *Paecilomyces sp*

Introducción

Estado actual de la investigación en productos naturales

Tradicionalmente, los productos naturales han sido una fuente importante de fármacos, *per se* o como moléculas líderes para el desarrollo de productos más eficaces [5,8-16]. Sin embargo, en las décadas comprendidas entre 1990 y 2010, la industria farmacéutica se inclinó por el desarrollo de nuevos fármacos a partir de moléculas generadas de librerías sintéticas, mediante procesos de evaluaciones farmacológicas de alto rendimiento (*High-Throughput Screening*, HTS por sus siglas en inglés) [17,18]. Las razones principales de este cambio de estrategia incluyen: (i) el tiempo y costo involucrado en los procesos de aislamiento y caracterización de productos naturales; (ii) los bajos rendimientos de estos productos; (iii) el aislamiento continuo de compuestos conocidos; (iv) la complejidad de muchas sustancias naturales que dificulta su síntesis; (v) y finalmente, en muchos casos las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos resultan incompatibles con los sistemas biológicos [18,19].

La eficacia limitada de las técnicas de HTS y química combinatoria para la generación de moléculas líderes, así como la prevalencia global de enfermedades degenerativas como el cáncer, la artritis reumatoide, la diabetes mellitus, y padecimientos infecciosos resistentes a tratamientos de última generación; han traído como consecuencia un interés renovado por la búsqueda de productos naturales con estructuras novedosas para solventar estos graves problemas de salud pública. Cabe hacer notar que en esta búsqueda es recomendable estudiar organismos provenientes de nichos ecológicos poco explorados, implementar métodos analíticos que permitan detectar rápidamente la presencia de moléculas conocidas y generar análogos con propiedades farmacocinéticas deseadas a través de procesos de síntesis parcial y biosíntesis dirigida.

Los microorganismos producen la mayoría de los fármacos de mayor importancia en la terapéutica contemporánea. La amplia diversidad estructural mostrada por los metabolitos bacterianos y fúngicos se refleja en sus múltiples actividades farmacológicas: muchos son antibióticos y fungicidas (penicilina, eritromicina, tetraciclina, vancomicina y anfotericina, etc.), otros anticancerígenos (daunorubicina, bleomicina, doxorubicina, mitomicina, etc.) e inmunosupresores (ciclosporina, rapamicina, etc.) y, - los menos -, antihipercolesterolemiantes (lovastatina y mevastatina) o antidiabéticos (acarbose).

En términos de biodiversidad, el reino fúngico constituye uno de los más vastos. Diversos estudios sugieren que existen entre 1.5 y 3.8 millones de especies fúngicas, de las cuales, sólo han sido identificadas alrededor del 5% y un número aun menor han sido estudiadas desde el punto de vista químico [22]. En este contexto, es evidente que existen muchos microorganismos fúngicos por estudiar con la finalidad de obtener nuevos metabolitos secundarios. Asimismo, un estudio realizado por Ito y colaboradores en 2011 demostró que cada microorganismo puede producir entre uno y tres metabolitos nuevos [24]. Tomando en cuenta estos datos, se estima que el reino fúngico tiene una reserva potencial de entre 5 y 15 millones de nuevos productos naturales, útiles en los campos de la medicina, agricultura e industria alimentaria [22]. Por lo tanto, la exploración de diferentes nichos ecológicos (ambientes terrestres y marinos) puede conducir al descubrimiento de nuevos microorganismos y prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos.

Por otra parte, un estudio reciente realizado por los grupos de investigación de los Doctores Medina-Franco y Figueroa de la Facultad de Química de la UNAM, demostró que los metabolitos secundarios aislados a partir de ascomicetos tienen las siguientes características:

- Presentan una elevada complejidad y diversidad estructural, así como propiedades fisicoquímicas

similares a las de fármacos aprobados por la FDA, compuestos en pruebas clínicas y *screening* en general. Por lo tanto, éstos son candidatos idóneos para la expansión del espacio químico-medicinal.

- Tienen el potencial de ser específicos.
- Son una fuente atractiva para la obtención de moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos [25].

Panorama mundial y nacional del cáncer

El cáncer, por otra parte, comprende una colección de enfermedades relacionadas en las que las células del cuerpo se dividen descontroladamente y se esparcen hacia los tejidos circundantes; se origina por cambios en los genes que controlan la forma en la que las células funcionan, específicamente en relación a cómo crecen y se dividen. Estos cambios genéticos pueden ser heredados u originarse en el curso de la vida de una persona, como resultado de la exposición a factores ambientales y/o antropogénicos (e.g. sustancias químicas cancerígenas, radiación e infecciones) [2].

El cáncer se ubica entre las principales causas de muerte a nivel mundial. En septiembre del 2018 se registraron más de 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad y se anticipa que en el 2040 se presentarán 29.5 millones de casos nuevos. En México, el número de casos incidentes se estimó en 190,667 al 2018 y se prevé que sean 359,542 en el 2040. A la fecha, el cáncer de mama es el de mayor incidencia en este país, con 27,283 casos reportados y 6,884 muertes asociadas a este tipo de cáncer [3].

Tratamiento del cáncer

Actualmente, la mayoría de los pacientes que padecen cáncer reciben una combinación de tratamientos, como cirugía y quimioterapia y/o radioterapia; mientras que algunos otros se someten a inmunoterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre, terapia dirigida (que contempla los cambios moleculares expresados por células cancerosas) y terapia personalizada (que se basa en los cambios genéticos particulares generados en el tumor de un paciente) [5].

Sin embargo, aun con los muchos avances que se han logrado en el tratamiento del cáncer en las décadas recientes, se deben vencer numerosos desafíos; ya que el cáncer de cada individuo comprende una constelación única de mutaciones genéticas y otras alteraciones que incrementan la complejidad en la identificación de tratamientos que funcionen con

mayor probabilidad en cada paciente. En ese sentido y debido a que el cáncer impacta en la calidad y esperanza de vida de un gran número de personas en México y en el mundo, la investigación en el tratamiento de esta enfermedad es fundamental.

Tratamientos derivados de productos naturales

Por otro lado, se sabe que en el área del cáncer, de 1940 a finales del 2014, de 175 moléculas pequeñas utilizadas clínicamente, el 75% fueron productos naturales *per se*, se basaron en estos, o de alguna forma mimetizan al producto natural [16].

Entre los principales blancos moleculares que se contemplan como candidatos para la actividad antitumoral de un producto natural están: agentes que interactúan con la tubulina, inhibición de topoisomerasa I y II, inhibición de histona deacetilasa, inhibición de proteínas cinasas, inhibición de proteínas de choque térmico, inhibición del proteosoma, agentes que interactúan con DNA (que no actúan como inhibidores de topoisomerasas), agentes que activan caspasas y/o inducen apoptosis, inhibición de factor inducible de hipoxia [26] y más recientemente, inhibición de la proteína calmodulina (CaM) [27].

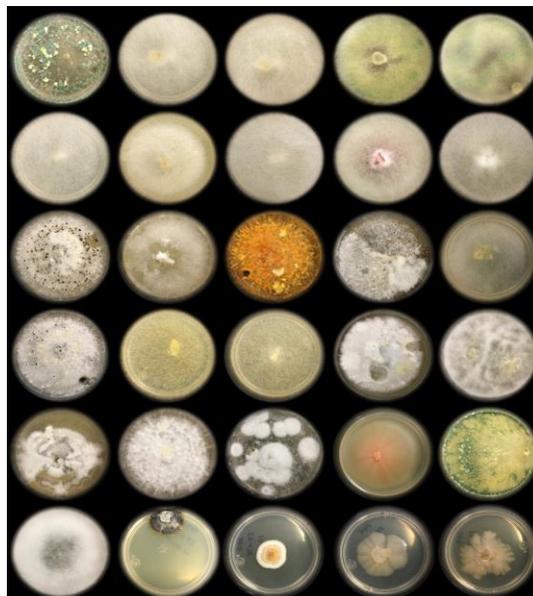


Figura 1. Muestra un cultivo de 14 días en medio sólido PDA de los aislamientos axénicos IQ-001-IQ-030.

Calmodulina y su importancia en el desarrollo y progresión de tumores

La CaM es considerada la principal proteína reguladora de calcio en células eucariotes. Su distribución ubicua, su elevada conservación durante la evolución, y su amplio espectro de funciones subraya la importancia de esta proteína de unión a calcio en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y patológicos [28-31].

Desde el punto de vista estructural, CaM es una proteína pequeña de 148 residuos de aminoácidos organizados en dos dominios globulares, cada uno con dos sitios de unión a Ca^{2+} [32]. Ambos dominios están unidos por un conector flexible, el cual está involucrado en las interacciones de CaM con sus proteínas blanco y antagonistas [30,32]. En su

conformación Apo, la CaM está cerrada por sus dos dominios homólogos. Una vez que el Ca^{2+} se une en ambos dominios, la conformación de la CaM cambia a la forma abierta, permitiendo que las proteínas blancas accedan a la cavidad hidrofóbica localizada en la parte interna de cada dominio [28]. Por lo tanto, los antagonistas de CaM generalmente poseen una parte hidrofóbica y una cadena lateral cargada. La parte hidrofóbica de los antagonistas es requerida para la unión con el carboxilo y/o amino terminal que se ubican en la cavidad hidrofóbica de la CaM, mientras que la cadena lateral previene que las proteínas blanco accedan a la cavidad hidrofóbica de esta [33].

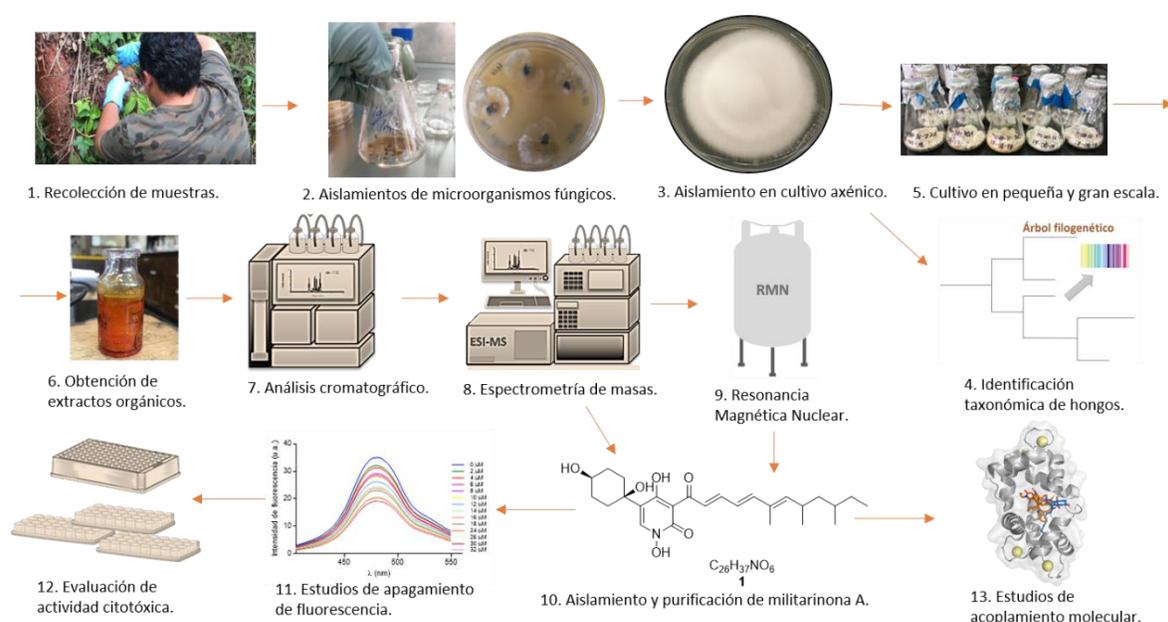


Figura 2. Estrategia general para la obtención de antagonistas de la CaM con actividad citotóxica a partir de microorganismos fúngicos. La metodología consta de 13 pasos, iniciando con la recolección de los sustratos para la obtención de microorganismos en cultivo axénico (1-3). Posteriormente, los microorganismos se cultivan inicialmente en pequeña escala por un periodo de 28 días (5), mientras se realiza la identificación taxonómica de los microorganismos aislados, a través de análisis filogenéticos (4). Transcurrido el periodo de fermentación, se obtiene el extracto orgánico utilizando metodologías convencionales (6). Enseguida, el extracto se fracciona utilizando diferentes técnicas cromatográficas hasta obtener los compuestos puros, que se caracterizan mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas (7-10). Una vez identificados los compuestos, se realizan diversos ensayos *in vitro* (11 y 12) e *in silico* (13).

Con relación al cáncer, la CaM se encuentra implicada en el desarrollo y progresión de tumores. Procesos tales como la activación de cinasas dependiente de ciclina/complejos de ciclina, el metabolismo de nucleótidos, la síntesis de DNA, la reorganización de cromosomas y la citocinesis son dependientes de la presencia de CaM [27].

Así, el flujo de calcio extracelular hacia el interior de la célula bajo la estimulación de factores de crecimiento es esencial para iniciar la proliferación

celular. El complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ desempeña un papel transductor en eventos de señalización mediante el control directo o indirecto de vías mitogénicas y de la maquinaria del ciclo celular; especialmente actuando en la transición de la fase G_1/S y en las fases G_2 y M [27].

Inhibidores de calmodulina; una oportunidad para tratar el cáncer

Los antagonistas de CaM inducen apoptosis en diversos modelos tumorales e inhiben la metástasis; algunos de los cuales han sido usados como agentes anticancerígenos [34], entre los que destacan la vincristina y vinblastina [30]. Esta evidencia pone de manifiesto que un antagonista de la CaM puede presentar actividad antitumoral.

En este contexto, el presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un programa multidisciplinario encaminado a la obtención de antagonistas de la CaM con posible actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales, a partir de microorganismos fúngicos aislados en regiones poco exploradas del territorio nacional.

El estudio inició con la obtención del material fúngico a partir de diversos sustratos colectados en el “Cerro del Sombrero”, Cuauhtepac, Ciudad de México. Posteriormente, los microorganismos obtenidos en cultivo axénico (Figura 1) se cultivaron en mediana escala utilizando dos diferentes medios sólidos de cultivo (arroz y Cheerios®) con la finalidad de establecer las mejores condiciones de fermentación. Concluido el periodo de crecimiento, se obtuvieron los extractos orgánicos mediante procesos de maceración y reparto. A continuación, se realizaron estudios de metabolómica dirigida utilizando cromatografía de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas

(UPLC-EM) y se seleccionaron los mejores candidatos para la obtención de nuevas entidades químicas. El procedimiento anterior permitió priorizar las cepas más prometedoras para su cultivo en gran escala y obtención de metabolitos secundarios, los cuales fueron caracterizados utilizando diversas técnicas espectroscópicas (Resonancia Magnética Nuclear, RMN) y espectrométricas (Espectrometría de Masas, EM). La actividad antagónica de los metabolitos aislados sobre la CaM se monitoreó utilizando el biosensor fluorescente *hCaM-M124C-mBBR* [70]. Los antagonistas de la CaM se evaluaron como agentes citotóxicos sobre las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 (cáncer de pecho), MDA-MB-435 (melanoma) y OVCAR3 (cáncer de ovario). Finalmente, se realizaron estudios de acoplamiento molecular con la CaM de los metabolitos caracterizados, con la finalidad de conocer su probable sitio de unión.

El procedimiento anterior (Figura 2) permitió seleccionar a la cepa IQ-023 como una fuente propicia de entidades químicas novedosas. La aplicación de técnicas de biología molecular, en particular el análisis de máxima similitud de la región espaciadora interna (ITS, por sus siglas en inglés) del aislamiento IQ-023 permitió identificar al microorganismo como una especie del género *Paecilomyces* [82] (Figura 3).

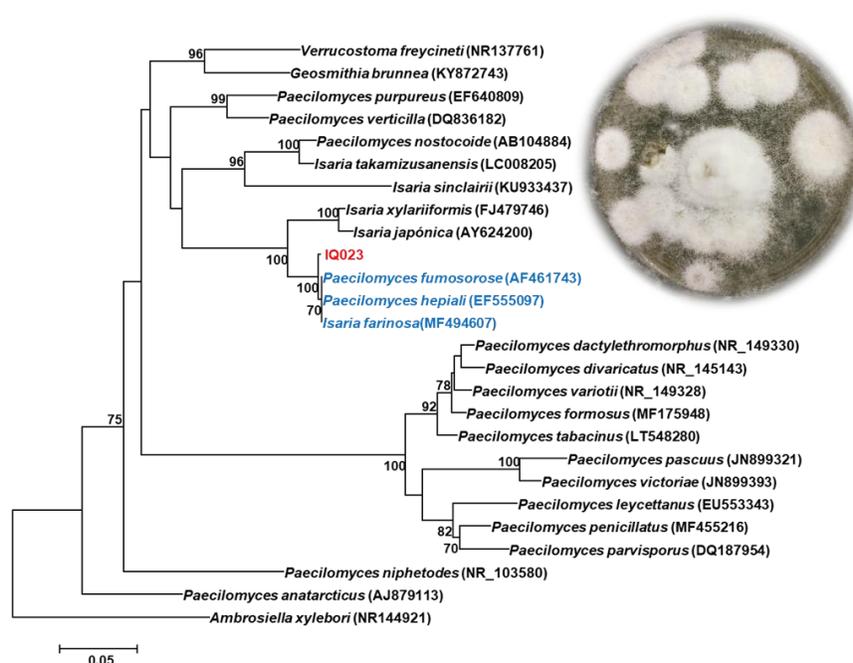


Figura 3: Análisis filogenético del aislamiento IQ-023. El análisis de máxima similitud de la región espaciadora interna (ITS, por sus siglas en inglés) de IQ-023 permitió identificar al microorganismo como una especie del género *Paecilomyces*.

Así, el estudio químico de *Paecilomyces* sp. (IQ-023), condujo al aislamiento de un sólido de color amarillo como el producto mayoritario en el extracto orgánico obtenido de la fermentación de 28 días en medio sólido Cheerios®. El análisis por espectrometría de masas de alta resolución (EM-ESI) permitió establecer su fórmula molecular como $C_{26}H_{37}NO_6$ con base en el ion pseudomolecular

$[M+H]^+ = 460.2668 \text{ m/z}$, calculado para $C_{26}H_{38}NO_6$ (Figura 4) [74]. Los espectros de 1H y ^{13}C -RMN fueron consistentes con los reportados para la militarinona A (1) (Figura 4) [74], un metabolito de biogénesis mixta aislado previamente de hongos de los géneros *Isaria* y *Paecilomyces*, dos géneros de microorganismos relacionados filogenéticamente.

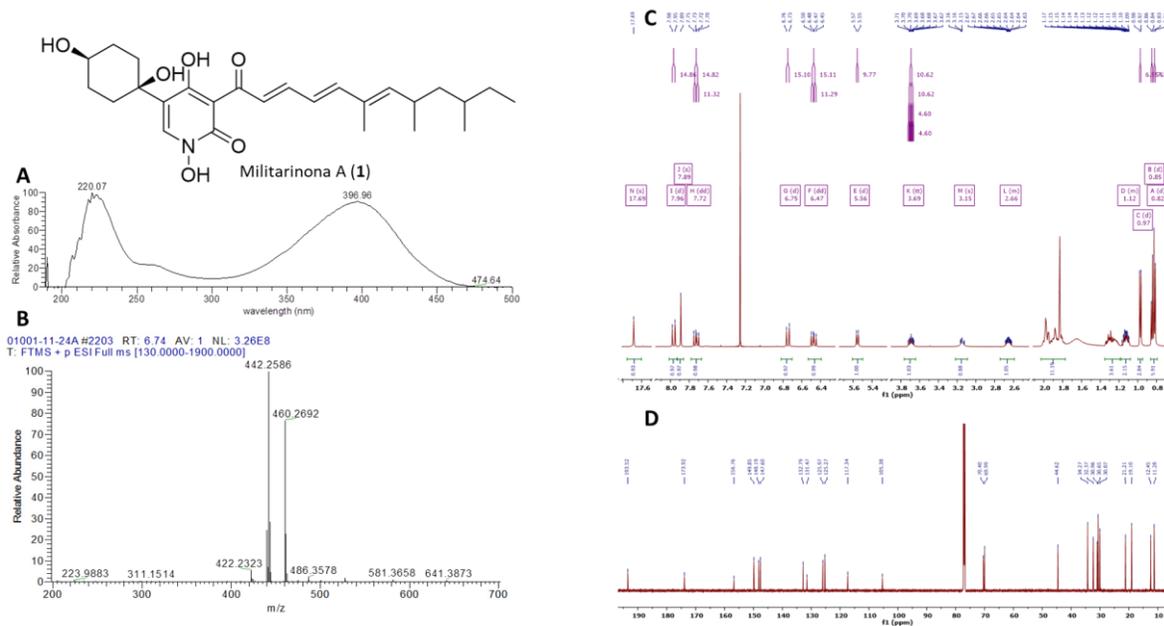


Figura 4. Análisis espectroscópico y espectrométrico de la militarinona A (1). Los paneles A, B, C y D muestran el espectro de ultravioleta-visible (UV-Vis), el espectro de masas de alta resolución obtenido por electro spray (EMAR-ESI) y los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (1H y ^{13}C -RMN) para la militarinona A (1), respectivamente.

Considerando la naturaleza anfipática de la militarinona A (1) (una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica) se decidió evaluar su actividad antagonista sobre la proteína CaM. Para ello se utilizó el biosensor fluorescente *hCaM-M124C-mBBR*, el cual presenta ciertas ventajas, entre las que resaltan: la posibilidad

de realizar mediciones directas en solución, utilización de una cantidad mínima de muestra, una alta sensibilidad y especificidad de unión, además de que permite realizar determinaciones cuantitativas de los parámetros de unión [70].

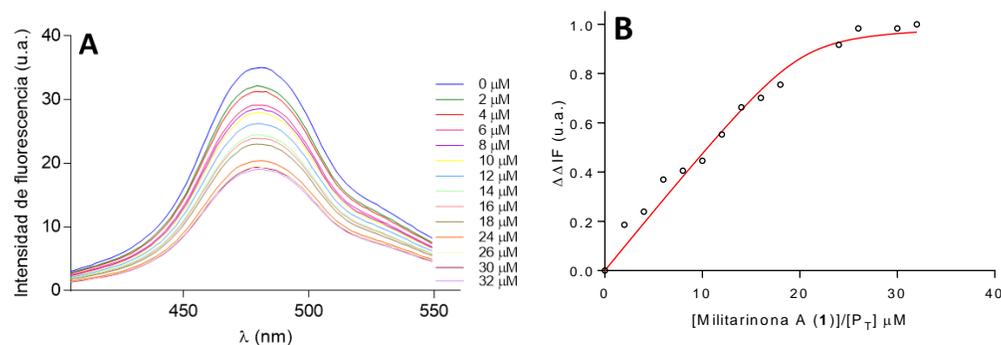


Figura 5. Ensayo de unión de militarinona con la CaM. Espectros de fluorescencia (A) y curva de titulación (cálculo de K_d) (B) del biosensor fluorescente *hCaM-M124C-mBBR* con concentraciones crecientes de militarinona A (1).

La interacción del compuesto **1** con el biosensor provoca cambios conformacionales que se reflejan en un cambio en el microambiente que rodea al fluoróforo, resultando en un apagamiento de la fluorescencia (Figura 5A), mismo que se atribuye a la formación del complejo *hCaM-M124C-mBBR-4Ca²⁺*-**1**. Los resultados de este ensayo indicaron que **1** se une a la CaM, con una K_d de 412.5 ± 0.25 nM (Figura 5B), tres veces más que la clorpromazina (1.25 ± 0.12 μ M), utilizado como control positivo y comparable con la de algunos metabolitos secundarios de microorganismos fúngicos, tales como: las emodinas de *Aspergillus* sp., las xantonas de *Emericella* 25379, las malbranqueamidas de *Malbranchea aurantiaca* y la chaetomina de *Chaetomium globosum*, por mencionar algunos [30].

Estudios previos señalan que los antagonistas de la CaM presentan actividad antitumoral [76,77]. Esta información, en conjunto con los resultados de unión a la CaM, motivaron la evaluación de **1** como agente citotóxico contra tres líneas celulares tumorales de importancia clínica (MDA-MB-231, MDA-MB-435 y OVCAR3). Los resultados de esta evaluación permitieron reconocer al compuesto **1** como un excelente agente citotóxico (Figura 6, Tabla 1), con concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) en el rango de 1.17-4.08 μ M, comparables con la CI₅₀ de 1.75 μ M reportada para la línea celular A549 (de carcinoma de pulmón) [78]. En este experimento el Taxol®, un producto natural, se utilizó como control positivo.

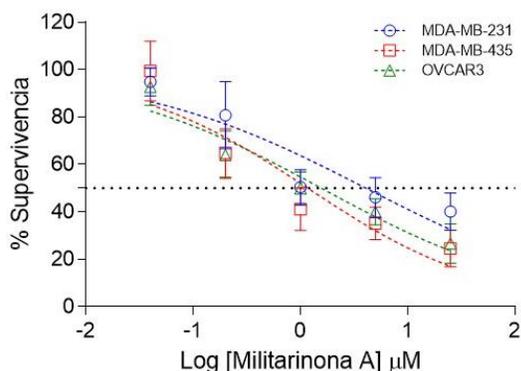


Figura 6. Actividad citotóxica. Curvas concentración-respuesta de la militarinona A (**1**) contra las líneas celulares MDA-MB-231 (círculos azules), MDA-MB-435 (cuadros rojos) y OVCAR 3 (triángulos verdes).

Finalmente, los estudios de acoplamiento molecular de **1** con la CaM se realizaron utilizando la estructura cristalográfica de la CaM cocrystalizada con trifluoroperazina (Código PDB: 1A29) como modelo. Los resultados del estudio indicaron que la **1** se une a la CaM de manera no clásica, en un sitio similar al del

compuesto KAR-2, un compuesto con actividad antitumoral derivado de la vinblastina (Figura 7A).

Los aminoácidos involucrados en la interacción son principalmente hidrofóbicos e incluyen a la Phe¹⁹, Leu³², Ile⁵², Val⁵⁵, Ile⁶³, Phe⁶⁸, Met⁷¹, Met⁷², Arg⁷⁴, Lys⁷⁵, Met⁷⁶ y Met¹⁴⁵. Las fuerzas que gobiernan la interacción incluyen enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo hidrofóbicas [30].

Tabla 1. Evaluación de la actividad citotóxica de la militarinona A (1**) contra diversas líneas celulares.**

Compuesto	CI ₅₀ (μ M)		
	MDA-MB-435	MDA-MB-231	OVCAR3
Militarinona A (1)	1.17	4.08	1.56
Control positivo	CI ₅₀ (nM)		
	MDA-MB-435	MDA-MB-231	OVCAR3
Taxol	0.43	166	5.12

Conclusión y perspectivas

Con este trabajo, se pone en evidencia el valor de los microorganismos fúngicos que habitan las regiones inexploradas del territorio nacional, como fuente fértil de entidades químicas novedosas con actividad biológica.

En particular, las especies del género *Paecilomyces* se proyectan como una mina de oportunidades para buscar agentes útiles en la terapéutica del cáncer. Es importante subrayar que la información generada en este proyecto constituye el primer reporte de la actividad antagónica de la militarinona A sobre la CaM, y permite proponer este mecanismo como la vía por la que ejerce su notable actividad citotóxica. Por lo tanto, surge la pertinencia de estudiar a aquellos análogos estructurales de Militarinona A como agentes inhibidores de CaM, citotóxicos y antitumorales; así como a las especies del género *Paecilomyces* y/o relacionadas con ésta.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación se realizó gracias al Programa UNAM-PAPIIT IA200818 "Productos naturales de origen fúngico y derivados con actividad para el control de la diabetes y/o infecciones bacterianas producidas por cepas resistentes a fármacos convencionales". José Rivera-Chávez agradece a la Dr. Beatriz Quirós por el registro de los espectros de RMN.

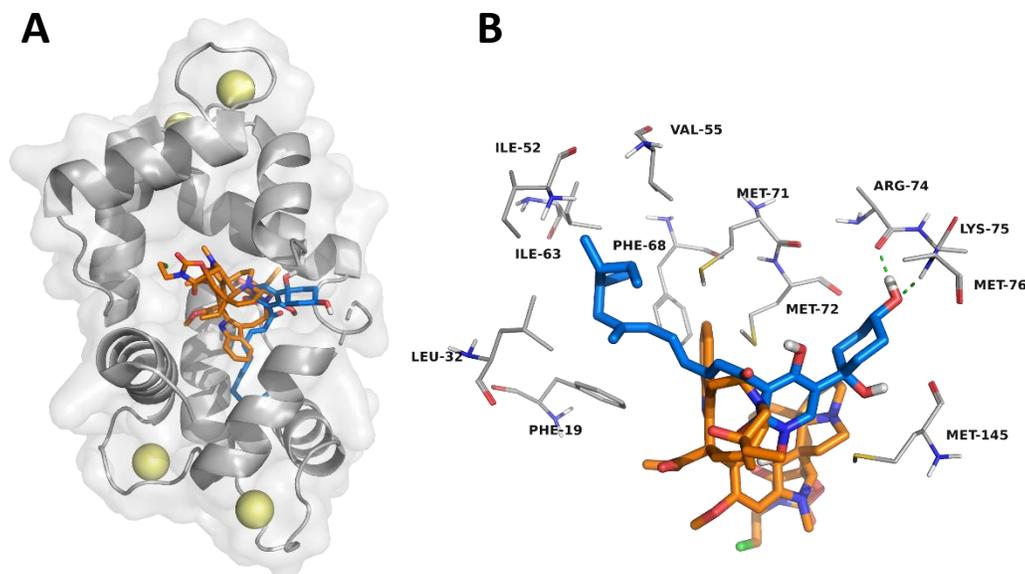


Figura 7. Modelo estructural generado para la militarinona A (1) en complejo con la calmodulina. La figura A muestra el sitio de unión del producto **1** (bastones azules) y el compuesto KAR-2 (bastones naranjas). La figura B muestra los aminoácidos involucrados en el sitio de unión del producto **1** con la CaM (bastones grises).

Referencias

- Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K. M. (2000) *Nat. Prod. Rep.* **17**, 215-234
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2004) *Curr. Med. Chem.* **11**, 1693-1713
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2007) *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477
- Newman, D. J. (2008) *J. Med. Chem.* **51**, 2589-2599
- Newman, D., and Cragg, G. (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2120
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2009) *Future Med. Chem.* **1**, 1415-1427
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., and Quinn, R. J. (2015) *Nat. Rev. Drug. Discov.* **14**, 111-129
- Kinghorn, A. D., De Blanco, E. J. C., Lucas, D. M., Rakotondraibe, H. L., Orjala, J., Soejarto, D. D., Oberlies, N. H., Pearce, C. J., Wani, M. C., Stockwell, B. R., Burdette, J. E., Swanson, S. M., Fuchs, J. R., Phelps, M. A., Xu, L., Zhang, X., and Shen, Y. Y. (2016) *Anticancer Res.* **36**, 5623-5637
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016) *J. Nat. Prod.* **79**, 629-661
- National Cancer Institute (NCI), Role in Cancer Treatment Research, 1-6
- Amirkia, V., and Heinrich, M. (2015) *Front. Pharmacol.* **6**, 1-8
- Koehn, F. E., and Carter, G. T. (2005) *Nat. Rev. Drug. Discov.* **4**, 206-220
- David, B., Wolfender, J.-L., and Dias, D. A. (2015) *Phytochem. Rev.* **14**, 299-315
- Pearce, C. (2011) *J. Ad. Pharm. Technol. Res.* **2**, 136-137
- Ito, T., Odake, T., Katoh, H., Yamaguchi, Y., and Aoki, M. (2011) *J. Nat. Prod.* **74**, 983-988
- González-Medina, M., Prieto-Martínez, F. D., Naveja, J. J., Méndez-Lucio, O., El-Elimat, T., Pearce, C. J., Oberlies, N. H., Figueroa, M., and Medina-Franco, J. L. (2016) *Future Med. Chem.* **8**, 1399-1412
- National Cancer Institute (NCI), www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer, 1-6
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018) *CA: Cancer J. Clin.* **68**, 394-424
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G., and Newman, D. J. (2009) *Chem. Rev.* **109**, 3012-3043
- Berchtold, M. W., and Villalobo, A. (2014) *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 398-435
- Finn, B. E., and Forsén, S. (1995) *Structure* **3**, 7-11
- Hudmon, A., and Schulman, H. (2002) *Biochem. J.* **364**, 593-611
- Mata, R., Figueroa, M., Gonzalez-Andrade, M., Rivera-Chavez, J. A., Madariaga-Mazon, A., and Del Valle, P. (2015) *J. Nat. Prod.* **78**, 576-586
- Xia, Z., and Storm, D. R. (2005) *Nat. Rev. Neurosc.* **6**, 267
- Vogel, H. J. (1994) *Biochem. Cell Biol.* **72**, 357-376
- Shim, J. S., Lee, J., Kim, K. N., and Kwon, H. J. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 747-751
- Wang, Z., Li, S., Shi, Q., Yan, R., Liu, G., and Dai, K. (2010) *Thromb. Res.* **125**, 340-350
- González-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., and Sosa-Peinado, A. (2009) *Anal. Biochem.* **387**, 64-70
- Yang, J. L., Xiao, W., He, H. X., Zhu, H. X., Wang, S. F., Cheng, K. D., and Zhu, P. (2008) *Acta Pharm. Sin. B* **43**, 421-426
- Schmidt, K., Gunther, W., Stoyanova, S., Schubert, B., Li, Z., and Hamburger, M. (2002) *Org. Lett.* **4**, 197-199
- Horvath, I., Harmat, V., Perczel, A., Palfi, V., Nyitray, L., Nagy, A., Hlavanda, E., Naray-Szabo, G., and Ovadi, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 8266-8274
- Orosz, F., Vertessy, B. G., Salerno, C., Crifo, C., Capuozzo, E., and Ovadi, J. (1997) *Br. J. Exp. Pathol.* **121**, 955-962
- Ma, C., Li, Y., Niu, S., Zhang, H., Liu, X., and Che, Y. (2011) *J. Nat. Prod.* **74**, 32-37

www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer

Cartel presentado en la XV Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, del 22 al 25 de mayo en San Luis Potosí, México:



PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN FÚNGICO, UNA FUENTE POTENCIAL DE LIGANTES DE CALMODULINA CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA.



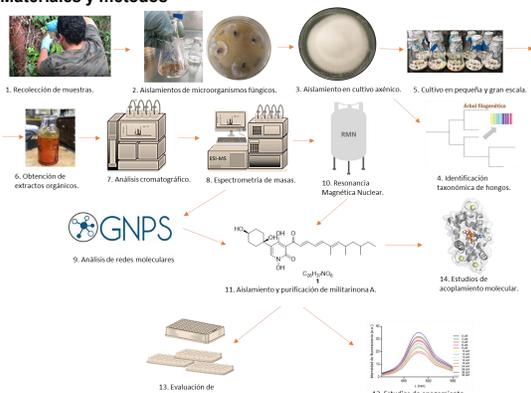
Enrique Aguilar-Ramírez¹, José Rivera Chávez¹, Jesús Morales Jiménez² y Martín González Andrade³

1) Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM (enriqueelpensador@gmail.com). 2) CONACYT-CHIDZA y División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. 3) Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Introducción

La calmodulina (CaM) es considerada la principal proteína reguladora de calcio en células eucariotas, y por lo tanto, regula numerosos procesos fisiológicos y patológicos¹. En el cáncer la CaM se encuentra implicada en el desarrollo y progresión de tumores². En este contexto, el presente trabajo se propuso obtener antagonistas de la CaM con actividad citotóxica, a partir de metabolitos secundarios de hongos microscópicos.

Materiales y métodos



1. Recolección de muestras. 2. Aislamiento de microorganismos fúngicos. 3. Aislamiento en cultivo axénico. 4. Cultivo en pequeña y gran escala. 5. Obtención de extractos orgánicos. 6. Análisis cromatográfico. 7. Espectrometría de masas. 8. Resonancia Magnética Nuclear. 9. Análisis de redes moleculares. 10. Identificación taxonómica de hongos. 11. Aislamiento y purificación de militarinona A. 12. Estudios de acoplamiento de fluorescencia. 13. Evaluación de actividad citotóxica. 14. Estudios de acoplamiento molecular.

Resultados

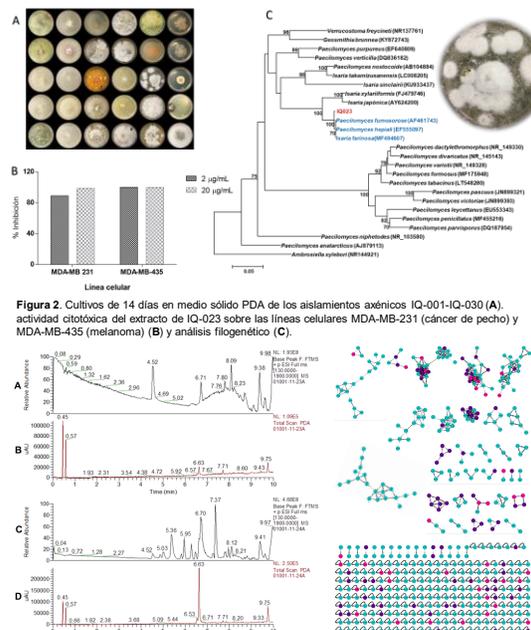


Figura 1. Estrategia general para la obtención de antagonistas de la CaM con actividad citotóxica a partir de microorganismos fúngicos

Figura 2. Cultivos de 14 días en medio sólido PDA de los aislamientos axénicos IQ-001-IQ-030 (A), actividad citotóxica del extracto de IQ-023 sobre las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de pecho) y MDA-MB-435 (metastoma) (B) y análisis filogenético (C).

Figura 3. Cromatogramas de IQ-023 cultivada en arroz (A y B) y Cherries® (C y D) y análisis de redes moleculares (GNPS).

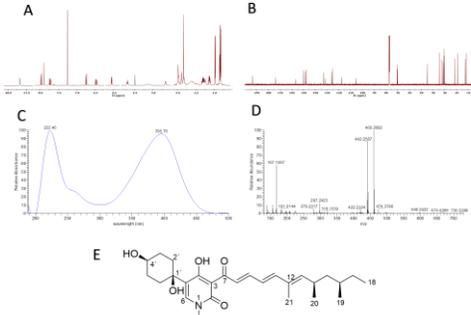


Figura 4. Espectros de RMN-¹H (A), RMN-¹³C (B), UV (C), masas (D) y estructura de la militarinona A (E).

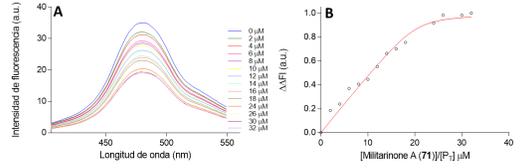


Figura 5. Ensayo de unión de militarinona A con la CaM. Espectros de fluorescencia (A) y curva de titulación (cálculo de K_d) (B) del biosensor fluorescente hCaM-M124C-mBBr con concentraciones crecientes de militarinona A.

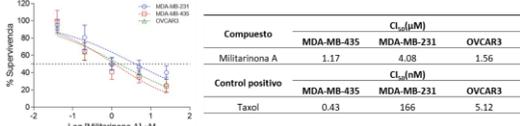


Figura 6. Actividad citotóxica de militarinona A.

Compuesto	CL ₅₀ (μM)		
	MDA-MB-435	MDA-MB-231	OVCA3
Militarinona A	1.17	4.08	1.56
Control positivo	CL ₅₀ (nM)		
Taxol	0.43	166	5.12

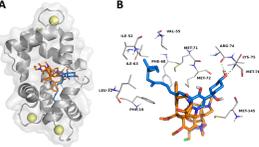


Figura 7. Acoplamiento molecular de militarinona A (bastones azules) y KAR-2 (bastones naranjas) con CaM (A) y aminoácidos involucrados en el sitio de unión (B).

Conclusiones

Con este trabajo, se pone en evidencia el valor de los microorganismos fúngicos que habitan las regiones inexploradas del territorio nacional, como fuente fértil de entidades químicas novedosas con actividad biológica. En particular, las especies del género *Paeclimyces* se proyectan como una mina de oportunidades para buscar agentes útiles en la terapéutica del cáncer. La información generada en este proyecto constituye el primer reporte de la actividad antagonista de militarinona A sobre la CaM, y permite proponer este mecanismo como la vía por la que ejerce su notable actividad citotóxica.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación se realizó gracias al Programa UNAM-PAPIIT IA200816 "Productos naturales de origen fúngico y derivados con actividad para el control de la diabetes y/o infecciones bacterianas producidas por cepas resistentes a fármacos convencionales". José Rivera-Chávez agradece a la Dr. Beatriz Quirós por el registro de los espectros de RMN.

Referencias

1. Finn, B. E.; Forsén, S. *Structure* 1995, 3, 7-11
2. Wang, Z.; Li, S.; Shi, Q.; Yan, R.; Liu, G.; Dai, K. *Thromb. Res* 2010, 125, 340-350